



Pedro Rafael da Costa Duarte

Licenciatura em Engenharia Biomédica

Impressão 3D de Polímeros Biocompatíveis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Isabel Ferreira, Professora Associada, DCM-FCT/UNL

Co-orientador: Ana Baptista, Investigadora Pós-Doutoramento, DCM-FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2018

Impressão 3D de Polímeros Biocompatíveis

Copyright © Pedro Rafael da Costa Duarte, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade.

Queria agradecer às minhas orientadoras Professora Isabel Ferreira e Ana Baptista pela inteira disponibilidade, profissionalismo, boa disposição e paciência neste meu último capítulo do mestrado, bem como a todos os meus colegas de laboratório, em particular à Ana Gaspar pela inteira disponibilidade. Queria também agradecer ao Professor Jorge Silva pelo apoio dado na realização dos testes de citotoxicidade.

Não me poderia esquecer de agradecer aos meus companheiros de jornada, da Escola Salesiana de Manique, que me acompanham até aos dias de hoje, aos quais agradeço por uma amizade que considero verdadeira e que há de perdurar até que a memória o permita.

Aos meus colegas de faculdade Alexandre Mogárrio, Miguel Morais, Bernardo Sousa e Marcos Rodrigues, sem eles este culminar não teria o mesmo significado.

À Beatriz Pinheiro, que esteve ao meu lado neste último ano de superação, com a sua alegria e assertividade contagiantes, ser a pessoa que qualquer ser humano quer ter ao seu lado.

Por último e sem menos importância à minha família. À minha irmã Catarina Duarte, exemplo de esforço e dedicação, à Mãe que qualquer pessoa desejaria ter, Maria Umbelina Duarte, matriarca incansável, exemplo de humanidade, profissionalismo, dedicação e boa disposição. Ao meu Pai, pessoa na qual sempre me espelhei, detentor do carácter e da sabedoria que um dia eu gostaria de ter, a ele agradeço não só pelo amparo, mas também pelo exemplo de Homem, todas as minhas vitórias são dele também, obrigado.

Resumo

O estudo desenvolvido nesta dissertação consiste em conceber e testar um material apto a ser utilizado em impressão 3D de uma prótese de traqueia, tendo em conta as condicionantes associadas à morfologia da mesma e a individualidade de cada paciente.

O material estudado teria de ser biocompatível, hermético, flexível o suficiente para poder ser introduzido oralmente, da maneira menos invasiva possível, com memória de forma, e que através de um estímulo externo, fosse possível que a sua estrutura ganhasse rigidez suficiente para permanecer no local adequado.

Selecionaram-se o PVDF e o β -TCP como constituintes de uma solução candidata ao material a ser estudado. Esta solução foi otimizada de forma a ser possível a sua impressão 3D, e após verificada as potencialidades morfológicas do material face ao objectivo proposto, serem efectuados os testes necessários (teste mecânico de tracção e teste de citotoxicidade).

Com os resultados do teste mecânico de tracção foi possível verificar que o Módulo de Young do material concebido, variava consoante a fase do material. Na fase mais flexível variou entre 9-11 MPa, e na fase mais rígida entre 29-31 MPa. A viabilidade celular foi também verificada. Tendo em conta os resultados dos testes, as impressões 3D personalizadas de uma possível prótese de traqueia foram concebidas.

Palavras-chave: impressão 3D, PVDF, biocompatibilidade, propriedades mecânicas

Abstract

The aim of the present study is to investigate a biomaterial composition that enable the 3D printing production of a required 3D piece. Therefore, tracheal prosthesis or similar can be easily replicated using a biocompatible material. For achieving such challenge goal different materials composition was tested and correlated with their mechanical and morphological properties as well as biocompatibility essays.

Concerning tracheal prosthesis, the properties envisaged are biocompatibility and enough flexibility to enable its insertion in the least invasive way while keeping the required compression strength.

A composite of PVDF and β -TCP was studied. After a first composition optimization of the paste to be printed in a 3D printer by extrusion, the percentage of each component was changed and correlated with the obtained properties.

The cellular viability was verified and depending on the material's phase (flexible vs solid), Young's Modulus is 9-11 MPa for flexible pieces while for the most rigid it reaches 29-31 MPa. The samples were immersed in simulated body fluid (SBF) for several hours and the impact on the mechanical properties was also analysed.

A first attempted of printing a small piece of a possible 3D tracheal prosthesis was successfully performed.

Keywords: 3D printing, PVDF, biocompatible, mechanical properties

Conteúdo

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ACRÓNIMOS	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE	5
3. MÉTODOS E MATERIAIS.....	21
4 ANÁLISE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 DIVERSAS APLICAÇÕES DE DIFERENTES COMPÓSITOS POLIMÉRICOS.....	9
FIGURA 2.2 SUTURAS DE POLÍMERO DE MEMÓRIA DE FORMA, COM AUTO AJUSTE.....	15
FIGURA 2.3 PRÓTESES DE SILICONE: (A) TUBO EM T DE MONTGOMERY; (B) TUBO EM Y; AND (C) PRÓTESE DE DUMON.....	16
FIGURA 2.4 MODELOS METÁLICOS AUTOEXPANSÍVEIS: (A) METALLIC UNCOATED STENT (ULTRAFLEX); (B) MODELO METÁLICO AUTOEXPANSÍVEL COM REVESTIMENTO DE SILICONE (ULTRAFLEX); (C) PRÓTESE COM REFORÇO DE SILICONE (POLYFLEX).....	17
FIGURA 2.5 PRÓTESE DE IMPRESSÃO 3D PAR SOLUCIONAR TRAQUEOMALACIA EM CRIANÇAS: (A) MODELO 3D EM FORMATO .STL; (B) MECANISMO DE ACÇÃO DA PRÓTESE; (C) PROJECCÃO 3D DA APLICAÇÃO DA PRÓTESE; (D) IMPRESSÃO 3D FINAL	19
FIGURA 2.6 ORELHA BIÓNICA.....	20
FIGURA 3.1 IMPRESSORA DE EXTRUSÃO CUSTUM MADE, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, FCT-UNL.....	23
FIGURA 3.2 MODELOS 3D, DE TESTE, EM FORMATO .STL E RESPECTIVAS IMPRESSÕES	24
FIGURA 3.3 EXEMPLO DE PROVETE IMPRESSO NA IMPRESSORA 3D, UTILIZADO NOS TESTES DE TRACÇÃO, AS DUAS PONTAS DO PROVETE FORAM CONCEBIDAS NO FORMATO APRESENTADO PARA EXISTIR SUPERFÍCIE DE TRACÇÃO NAS GARRAS.....	25
FIGURA 3.4 GRÁFICO DE TENSÃO VERSUS DEFORMAÇÃO	26
FIGURA 4.1 EXTRUSÃO MANUAL COM RECURSO A AGULHA DE DISTRIBUIÇÃO CÓNICA 0.7MM (A) AMOSTRA SEM ESTAR EM CONTACTO COM ÁGUA (B) AMOSTRA QUE ESTEVE EM CONTACTO COM ÁGUA.	32
FIGURA 4.2 AMOSTRAS DA VARIAÇÃO 30%/70% (%DMF/%DMSO) APÓS 24H GUARDADAS NUMA CAIXA DE PETRI (A); AMOSTRAS APÓS 24H EM CONTACTO COM ÁGUA(B); AMBAS ATRAVÉS DE EXTRUSÃO MANUAL COM RECURSO A AGULHA METÁLICA 0,5MM	36
FIGURA 4.3 – FORMA DO MATERIAL IMPRESSO RECORRENDO À TÉCNICA DE IMPRESSÃO 3D POR EXTRUSÃO: (A) AMOSTRA QUE NÃO ESTEVE EM CONTACTO COM SBF; (B) AMOSTRA QUE FOI EXPOSTA AO SBF (1 SEMANA).....	38

FIGURA 4.4 CURVA TÍPICA OBTIDA NOS ENSAIOS DE TRACÇÃO (AMOSTRA EXPOSTA 24H AO AR)	40
FIGURA 4.5 EXEMPLO DO CÁLCULO DO MÓDULO DE YOUNG ATRAVÉS DO GRÁFICO ANTERIOR	40
FIGURA 4.6 MODELOS 3D EM FORMATO .STL DE UM PACIENTE RECORRENDO A UM EXAME DE TOMOGRAFIA COMPUTORIZADA: (A) MODELO INICIAL; (B) MODELO DEPOIS DE ALGUMAS ALTERAÇÕES; (C) MODELO PRONTO PARA IMPRESSÃO.	42
FIGURA 4.7 (A) MODELO 3D EM FORMATO .STL UTILIZADO NAS AMOSTRAS FINAIS DO PROJECTO; (B) MODELO EM ESTÁGIO INTERMÉDIO ENTRE A RECOLHA (TOMOGRAFIA COMPUTORIZADA) E O MODELO FINAL	42
FIGURA 4.8 MODELO 3D EM FOMATO .STL CONCEBIDO ATRAVÉS DO SOFTWARE AUTODESK® FUSION 360™(A)(B); AMOSTRA DE IMPRESSÃO 3D POR EXTRUSÃO, DO FICHEIRO EM FORMATO .STL(C)(D)	43
FIGURA 4.9 (MODELO 3D EM FOMATO .STL CONCEBIDO ATRAVÉS DO SOFTWARE AUTODESK® FUSION 360™(A)(B); AMOSTRA DE IMPRESSÃO 3D POR EXTRUSÃO, DEPOIS DE ESTAR EM CONTACTO COM SBF DURANTE UMA SEMANA, DO FICHEIRO EM FORMATO .STL(C)(D).....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DE TECIDOS RÍGIDOS	6
TABELA 2.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE TECIDOS MOLES	7
FIGURA 2.3 POTENCIAIS APLICAÇÕES DE SMP'S EM DISPOSITIVOS MÉDICOS	12
TABELA 3.1 CLASSIFICAÇÃO QUALITATIVA DA VIABILIDADE CELULAR RELATIVA	28
TABELA 4.1 – RESULTADOS DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE, RECORRENDO AO MÉTODO DO EXTRACTO DAS AMOSTRAS CONCEBIDAS ATRAVÉS DA <i>MISTURA 1</i>	33
TABELA 4.2 COMBINAÇÃO NA QUANTIDADE DE DMF E DMSO USADAS NA MISTURA 2 MANTENDO A RELAÇÃO PVDF E B-TCP.....	35
TABELA 4.3 RESUMO DOS 3 TIPOS DE VARIAÇÃO DA MISTURA 2, SUBMETIDOS AOS TESTES DE CITOTOXICIDADE.....	36
TABELA 4.4 RESULTADOS DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE, RECORRENDO AO MÉTODO DO EXTRACTO DAS AMOSTRAS CONCEBIDAS ATRAVÉS DAS VARIAÇÕES DA MISTURA 2, APRESENTANDO-SE APENAS OS RESULTADOS DA 1ª DILUIÇÃO	37
TABELA 4.5 – MÓDULO DE YOUNG DAS AMOSTRAS TESTADAS; PARA CADA VARIAÇÃO FORAM TESTADAS ENTRE 5 A 8 AMOSTRAS, SENDO QUE O VALOR APRESENTADO REPRESENTA A MÉDIA.	41
TABELA 4.6 TENSÃO DE RUPTURA DAS AMOSTRAS TESTADAS; PARA CADA VARIAÇÃO FORAM TESTADAS ENTRE 5 A 8 AMOSTRAS, SENDO QUE O VALOR APRESENTADO REPRESENTA A MÉDIA.	37

Lista de Acrónimos

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
β - TCP	Tri-cálcio fosfato (fase β)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
PVC	Policloreto de polivinila
PTFE	Politetrafluoretileno
PEEK	Polieteretercetona
PGA	Poli(ácido glicólico)
PDS	Polidioxanona
PET	Polietileno tereftalato
PMMA	Polimetil-metacrilato
SMP	<i>Shape memory polymers</i>
PEGDA	Poli (etilenoglicol)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
SBF	<i>Simulated body fluid</i>

1. Introdução

1.1 Contextualização

Os polímeros sintéticos conquistaram uma relevância tal na vida moderna, que em pleno século XXI, conjecturar a sua ausência do quotidiano é um exercício quase impossível. Sem excepção, e em particular nas últimas duas décadas, a área da saúde está directamente ligada com o desenvolvimento destes materiais de base polimérica biocompatíveis.

Os avanços tecnológicos na área dos biomateriais, culminam com a produção de materiais que permitem um aumento da qualidade de vida dos utentes. Tais avanços são consequência da constante mudança/evolução no estilo de vida da população, de um progressivo aumento da esperança média de vida e até por uma pressão social para uma diminuição dos custos da saúde devido a um aumento de consciencialização, por parte do público, da eficiência e *performance* elevada recorrendo a este tipo de materiais [1].

A área tecnológica dos biomateriais serve de base para o desenvolvimento e progresso de novas estratégias de abordagem em diversos sectores como engenharia dos tecidos, nanotecnologia, transporte de agentes bioactivos e até a reparação/restruturação da função de tecidos. Os biomateriais podem ser classificados como: metais, cerâmicos, polímeros naturais ou sintéticos e compósitos. Os polímeros representam uma grande e promissora classe dos biomateriais, devido ao seu baixo custo de produção, bem como à facilidade com que podem ser sintetizados, oferecendo todo um espectro de propriedades e funcionalidades [2].

Como uma tecnologia emergente, a impressão 3D, tem vindo a revelar-se muito útil na investigação científica, em particular no desenvolvimento de polímeros. Os contínuos avanços na forma como os produtos são desenhados e concebidos, permite uma produção de protótipos, com um baixo custo e alta eficiência [3].

A possibilidade de produzir por impressão 3D materiais de base polimérica, flexíveis mas que tenham capacidade de endurecer na presença de pH, humidade, fluidos corporais, temperatura, etc, tem um interesse e impactos tremendos na área da

biomédica. É nesse sentido que os estudos realizados neste trabalho pretendem dar um pequeno contributo para o avanço do estado da arte.

1.2 Objectivos

Este estudo tinha como objetivo principal obter uma estrutura 3D anatómica igual à original (traqueia), recorrendo a um material de base polimérica, biocompatível, compacto, flexível e com características morfológicas que permitam o seu endurecimento posterior em função do pH, da humidade ou temperatura do meio fisiológico com o qual está em contacto. Para tal, foram estudadas várias soluções poliméricas com características que permitam ser extrudidas e ficar com a consistência necessária para que camada a camada seja crescida uma peça com um desenho pré-definido em 3 dimensões. Após impressão as peças 3D foram submetidas a diferentes meios para verificar a influência destes nas suas propriedades mecânicas.

2. Estado da Arte

2.1 Polímeros

Atualmente vários polímeros naturais ou sintéticos têm sido utilizados em aplicações biomédicas devido à sua comprovada biocompatibilidade.

2.1.1 Polímeros naturais e sintéticos biocompatíveis

Biomateriais são materiais feitos pelo homem ou de origem natural, utilizados para apoiar, dirigir ou substituir funções de tecidos vivos do corpo humano. O uso de biomateriais remonta até às mais antigas civilizações chegando até a encontrar-se olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais em múmias egípcias. Na China e na Índia utilizavam-se ceras, colas e tecidos na reconstrução de partes malformadas do corpo ou até mesmo na ausência dos mesmos [4][5].

Ao longo dos séculos, avanços na área de síntese de materiais, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização têm vindo a permitir aplicação de biomateriais nas mais variadas formas. A prática clínica de hoje utiliza frequentemente um grande número de dispositivos e implantes. Os biomateriais como implantes (suturas, placas ósseas, substitutos de articulações, ligamentos musculares, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares, implantes dentários etc.) e dispositivos médicos (pacemakers, biossensores, corações artificiais, vasos sanguíneos etc.) são amplamente utilizados para substituir e/ou repor a função de tecidos ou órgãos degenerados levando à melhoria de função e correcção de anomalias, e portanto, ao aumento da qualidade de vida do paciente [6].

Antigamente todos os tipos de materiais como borracha, madeira e cola bem como produtos manufacturados como ouro, ferro, zinco e vidro, foram utilizados como biomateriais baseando-se na tentativa e erro. As respostas do hospedeiro a estes materiais eram extremamente variadas, sob determinadas condições (características do

tecido hospedeiro e procedimento cirúrgico) alguns materiais eram tolerados pelo corpo, enquanto que, noutras, os mesmos materiais seriam rejeitados.

Ao longo dos últimos 30 anos, têm-se verificado progressos consideráveis na compreensão das interacções entre os tecidos e os materiais. Geralmente, os tecidos agrupam-se em tecidos rígidos ou moles. Ossos e dentes são exemplos de tecidos rígidos. A pele, vasos sanguíneos, cartilagem e ligamentos são exemplos de tecidos moles. Como as respectivas designações sugerem, os tecidos rígidos são mais duros (módulo da elasticidade) e mais fortes (tensão de ruptura) que os tecidos moles (tabelas 2.1 e 2.2) [7].

Tabela 2.1 – Propriedades mecânicas de tecidos rígidos [8]

Tecido Rígido	Módulo de Young (GPa)	Tensão de Ruptura (MPa)
Osso cortical (direcção longitudinal)	17,7	133,0
Osso cortical (direcção transversal)	12,8	52,0
Osso trabecular	0,4	7,4
Esmalte	84,3	10,0
Dentina	11,0	39,3

Tabela 2.2 – Propriedades mecânicas de tecidos moles [8]

Tecido Mole	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)
Cartilagem articular	10,5	27,5
Cartilagem fibrosa	159,1	10,4
Ligamentos	303,0	29,5
Tendões	401,5	46,5
Pele	0,1-0,2	7,6
Tecido arterial (direcção longitudinal)	-	0,1
Tecido arterial (direcção transversal)	-	1,1
Lente intraocular	5,6	2,3

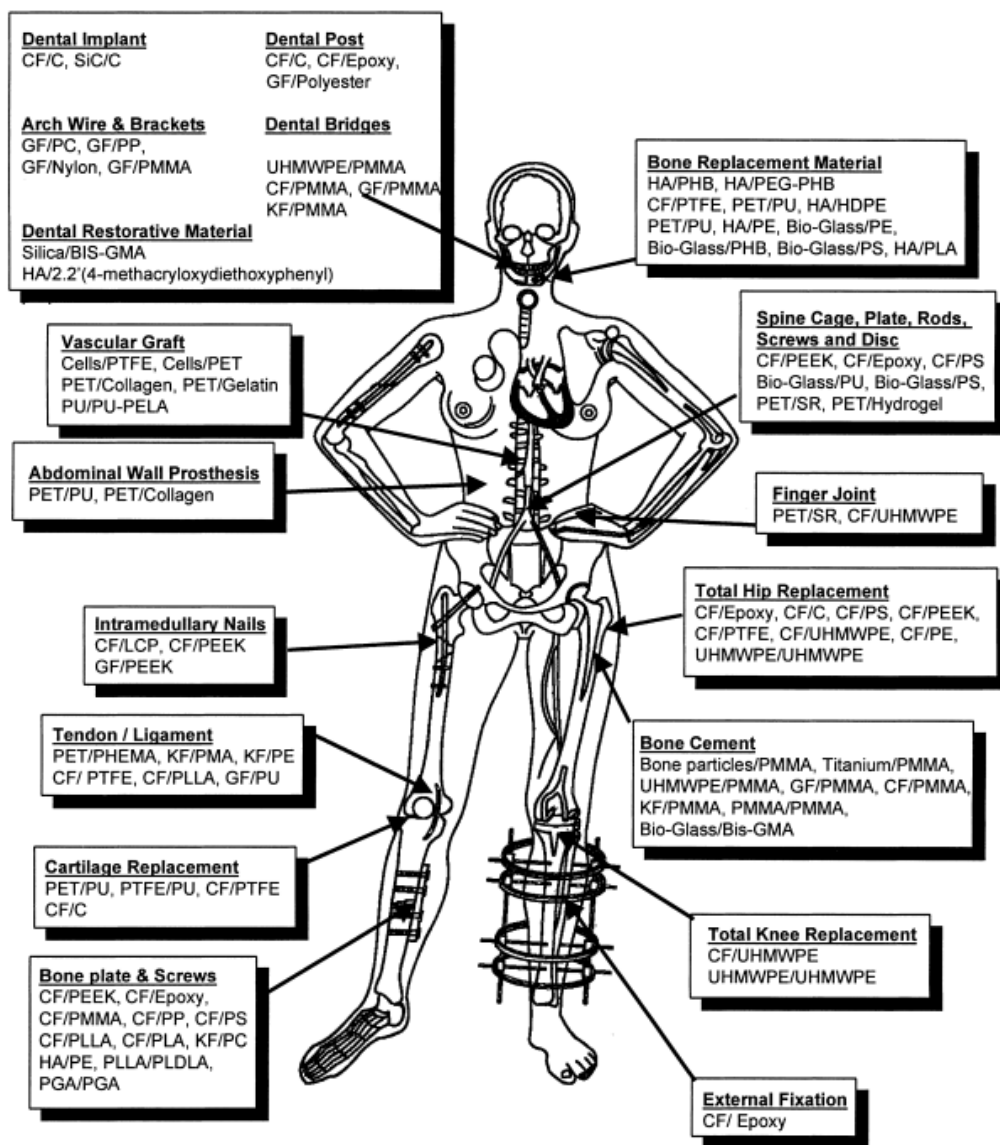
Os termos “biomaterial” e “biocompatibilidade” indicam a performance biológica dos materiais. Materiais esses, que quando biocompatíveis, se chamam biomateriais, e a biocompatibilidade é um conceito que reflecte a capacidade de determinado material cumprir a sua função, com uma resposta apropriada por parte do hospedeiro, numa aplicação específica. Simplificando, implica a compatibilidade ou harmonia do biomaterial com o sistema vivo. Wintermantel E. e Mayer J. et. al, foram mais além com esta definição e distinguiram entre compatibilidade superficial e estrutural de um implante. A compatibilidade superficial significa a adequação química, biológica e física da superfície do implante nos tecidos do hospedeiro. Espera-se, por exemplo, que os biomateriais funcionem no ambiente interno do corpo humano que pode ser bastante agressivo, por exemplo, sabe-se que o pH de fluidos corporais nos diversos tecidos pode variar entre 1 e 9. Já a compatibilidade estrutural, refere-se à adaptação óptima ao comportamento mecânico do sistema onde o implante está inserido, salientando-se as propriedades mecânicas do material, como por exemplo o módulo da elasticidade (Módulo de Young) [8] [9] [10].

A interacção ideal entre o hospedeiro e o biomaterial dá-se quando a compatibilidade superficial e a estrutural se equilibram. Além disso, enfatiza-se que o sucesso de um biomaterial no corpo depende de muitos outros factores como a técnica na cirurgia, condições de saúde e actividades do paciente.

Os diversos materiais utilizados em aplicações biomédicas agrupam-se em metais, cerâmicos, polímeros e compósitos feitos de misturas dos anteriores. Estudos anteriores também classificam materiais em diversos tipos como bioinertes e bioactivos, bioestáveis e biodegradáveis, etc. [11]

A maior parte dos polímeros são utilizados nas mais diversas áreas, isto deve-se à sua disponibilidade e variedade em composição, propriedades e formas (sólidos, fibras, tecidos, películas e géis). Contudo tendem a ser demasiado flexíveis e fracos para corresponder as exigências mecânicas de determinadas aplicações. Podem ainda absorver líquidos e inchar, libertando compostos indesejáveis (monómeros, antioxidantes etc.) dependendo da aplicação. Além disso, os processos de esterilização (autoclave, óxido de etileno e irradiação) podem afectar as propriedades do polímero em estudo.

Um grande número de polímeros como polietileno (PE), poliuretano (PU), politetrafluoroetileno (PTFE), poliacetato (PA), polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno tereftalato (PET) e poli(ácido láctico) (PLA) são utilizados em várias aplicações biomédicas. A figura seguinte (figura 2.1) resume as mais variadas aplicações de diferentes compósitos poliméricos.[7].



CF: carbon fibers, C: carbon, GF: glass fibers, PMMA: Polymethylmethacrylate, PS: polysulfone, PP: polypropylene, UHMWPE: ultra-high-molecular weight polyethylene, PLDLA: poly(L-DL-lactide), PGA: polyglycolic acid, PC: polycarbonate, PEEK: polyetheretherketone, HÁ: hydroxypatite, PMA: polymethylacrylate, BIS-GMA: bis-phenol A glycidyl methacrylate, PU: polyurethane, PTFE: polytetrafluoroethylene, PET: polyethyleneterephthalate, PEA: polyethylacrylate, SR: silicon rubber, PELA: block co-polymer of lactic acid and polyethylene glycol, LCP: liquid crystalline polymer, PHB: polyhydroxybutyrate, PEG: polyethyleneglycol, PHEMA: poly(20hydroxyethyl methacrylate)

Figura 2.1 – Diversas aplicações de diferentes compósitos poliméricos [7]

O PVC (policloreto de polivinila) plastificado foi um dos primeiros polímeros a ser utilizado em cateteres. Evita-se, hoje em dia, devido aos plastificantes e é apenas utilizado em aplicações a curto prazo como cateteres venosos periféricos. Já os poliuretanos termoplásticos, são os polímeros chave em cateteres, uma vez que não necessitam de plastificantes. Cateteres vasculares à base de silicone são inseridos para

acesso a longo prazo (semanas a meses), frequentemente para hemodiálise. O silicone é mais suave que os poliuretanos, minimizando o risco de danos vasculares.[12]

O PTFE, é normalmente, utilizado como revestimento interno de cateteres, de maneira a promover a mobilidade do fio-guia. Alternativamente, polimida ou PEEK (Polieteretercetona) podem revestir cateteres de suporte devido à sua elevada resistência mecânica. Co-polímeros de poliamida em bloco são frequentemente utilizados como camada externa desses mesmos cateteres, uma vez que combinam a flexibilidades dos poliuretanos com a força do nylon. Os balões dos cateteres de intervenção são tipicamente feitos de poliéster ou de poliamida de nylon 11 ou 12 devido à sua força de tensão [13].

Os polímeros são utilizados no contexto da cirurgia em geral como materiais de sutura e agafos, sendo selecionados pela sua força de tensão, fricção no tecido, degradação e estabilidade. Os materiais de sutura biodegradáveis são à base de colagénio enquanto que os biopolímeros não degradáveis são constituídos por seda ou celulose (algodão). Os materiais sintéticos reabsorvíveis são PGA (poli(ácido glicólico)) (Vicryl) e PDS (polidioxanona) (Monocryl). Os materiais de sutura que não são absorvidos pelo organismo são nylon, polietileno, polipropileno, poliéster, polibutéster e PVDF [14].

Rede reconstrutivas – *surgical mesh*, em cirurgia geral, ao suportarem órgãos e tecidos previnem prolapsos ou hérnias. Classificam-se de acordo com a dimensão ou peso, uma vez que estes aspectos são mais relevantes para a resposta biológica do que o material em si. Os polímeros principais na elaboração destas redes não reabsorvíveis são PP, PTFE, PET (polietileno tereftalato) ou PVDF. Salienta-se que redes à base de PVDF normalmente induzem uma menor resposta inflamatória e poros maiores (< que 1mm), em oposição a poros menores, surtem um efeito semelhante [15].

O cimento ósseo tem como propósito a ancoragem de uma prótese articular ao osso e deverá proporcionar uma transferência de peso homogénea do implante para o osso. PMMA é predominantemente utilizado para este fim, em associação com o antibiótico gentamicina. Como PMMA não promove a adesão óssea, aconselha-se a utilização de partículas de hidroxiapatita. A reacção de polimerização de PMMA é exotérmica e o calor resultante desta pode causar danos nos tecidos adjacentes. Os cimentos à base de fosfato de cálcio possuem uma excelente biocompatibilidade apesar das suas propriedades mecânicas não permitirem a sua aplicação em situações de suporte.

Destacam-se as principais aplicações com este material na área da Medicina Dentária e Cirurgia Craniana [16][17].

Qualquer implante provoca uma reacção por parte dos tecidos do receptor. Esta reacção normalmente ocorre na interface entre o implante e o tecido. O uso de um polímero adequado é essencial para reduzir tais reacções.

No caso concreto deste trabalho optou-se por estudar um polímero já utilizado em várias outras aplicações biomédicas, verificar possibilidade de impressão 3D através de extrusão e averiguar as suas propriedades mecânicas após contacto com diferentes meios.

O fluoreto de polivinilideno (PVDF) é um polímero de longa cadeia, semi-cristalino normalmente comercializado em pó, grânulos ou filmes. A dimetilformamida (DMF) e o dimetilsulfóxido (DMSO) actuam como solventes na sua solução (entre outros). Possui uma temperatura de fusão aproximadamente de 170°C, sendo que a sua temperatura de transição vítrea é normalmente por volta dos -40°C (a esta temperatura o polímero apresenta-se flexível e com boas propriedades mecânicas) [18].

Devido às suas características químicas e físicas tais como a excepcional estabilidade à radiação e raios UV, excelente biocompatibilidade, comportamento piezoelétrico, resistência microbiológica, resistência à abrasão bem como à força mecânica este polímero é utilizado para produzir filmes/membranas, com os mais variados propósitos, desde tubos para o transporte de água ultrapura, isolamento em cabos elétricos até ao estudo de *space mirrors* no âmbito do aquecimento global [19] [20][21][22].

Piezoelasticidade pode ser encontrada nas mais variadas partes do ser humano tais como ossos, ligamentos, etc. Materiais eletroactivos à base de polímeros piezoelétricos apresentam uma forte potencialidade por serem capazes de mimetizar o ambiente biológico do tecido através de estímulos eletromecânicos. Devido às comprovadas propriedades piezoelétricas, o PVDF tem sido alvo da atenção da investigação da engenharia dos tecidos.

Em termos de aplicações na área da biomedicina alguns exemplos foram publicados, tais como, Young et al. fabricou micromembranas microporosas de PVDF utilizadas no desenvolvimento de tecidos neuronais. Ou até o seu uso como base para a combinação,

células estaminais-polímeros, é uma realidade, suportando a adesão e proliferação celular [24][25].

Quando combinado o PVDF com o tri-cálcio fosfato (TCP), a bioactividade do material aumenta, ou seja existe uma maior propensão para a reprodução e aderência de células. O TCP, sendo biocompatível é bastante usado para a produção de *scaffolds* (como substitutos ósseos), fornecendo porosidade ao material, necessária para o crescimento celular [26].

2.1.2 Polímeros com memória de forma

Sistemas vivos respondem a estímulos externos adaptando-se eles próprios consoante a variação das condições. Recriar este comportamento tem sido o foco de vários investigadores nas últimas décadas utilizando os chamados *smart polymers*.

Smart polymers são definidos como polímeros que podem reverter física ou quimicamente as suas características através de pequenas mudanças das condições do ambiente, tais como a temperatura, pH, luz, campo magnético e/ou eléctrico, factores iónicos, moléculas biológicas, entre outros [27].

Muitas vezes, dois ou mais estímulos podem ser combinados ampliando a gama de funcionalidades. Alguns exemplos de aplicações são (bio)sensores, sistemas de libertação controlada de agentes terapêuticos (fármacos ou genes), engenharia de tecidos (*scaffolds*), superfícies termossensíveis, novos biocatalisadores imobilizados e suportes para cultura de células [28] [29].

Os polímeros com memória de forma ou do Inglês - *Shape memory polymers* (SMP), pertencem a uma classe de polímeros inteligentes. Estes são materiais que podem ser programados para memorizar uma forma/configuração, isto é, são conformados com uma determinada forma que pode mudar por exemplo por variação da temperatura e que retomam a forma original após ter sido retirado o estímulo fornecido[30].

Baseado na natureza do estímulo externo, SMP podem ser categorizados em fotossensíveis, químico-sensíveis, sensíveis ao campo magnético, sensíveis à temperatura, entre outros[31].

A primeira referência a memória de forma reporta a 1940. Aplicações industriais foram implementadas em 1950 por Paul Cook, químico fundador da Raychem Corporation, inventando tubos que mirravam com o calor usando *radiation-crosslinked polyethylenes* [32] [33].

O termo SMP foi popularizado por empresas como CDF-Chimie (França), Nippon Zeon Company (Japão) nos anos 80, dando início então à primeira geração de ouro no que diz respeito a pesquisa de SMP, que primeiramente se focava em sistemas baseados em polietileno, até serem introduzidos SMP baseados em poliuretano, introduzidos por Mitsubishi Heavy Industry no início dos anos 90. [34]

Ao longo das últimas duas décadas, a temática dos materiais com memória de forma no âmbito de aplicações biomédicas (tabela 2.3), tem vindo a tornar-se numa área de investigação bastante activa. Isto pode ter como explicação a aposta da tendência clínica nas técnicas o menos invasivas possível. A implantação de objectos inicialmente pequenos que, mais tarde, se desdobram e desenvolvem em objectos maiores e com a funcionalidade desejada, frequentemente depende das forças mecânicas inerentes à recuperação de forma.

Os materiais de memória de forma deverão ser aplicados como materiais inteligentes, com base nas suas características únicas relacionadas com o efeito de memória de forma. Em materiais com memória de forma, não só a recuperação da forma, mas também a fixação da forma pode ser obtida e, por isso, as aplicações esperadas têm um vasto leque.

Tabela 2.3 – Potenciais aplicações de de SMP's em dispositivos médicos [35]

Dispositivo SMP	Utilidade
Sutura de auto ajuste	Linha cirúrgica capaz de formar um nó auto ajustável.
Fecho cirúrgico	Uma agulha biodegradável e bioestável que após inserção, curva e assume uma forma helicoidal mediante determinada temperatura, assegurando a integridade da sutura.
Tratamento para aneurismas	Dispositivos SMP (fibras ou espuma) que preenchem vasos sanguíneos dilatados em balão ou próteses que alinham a interface interior do vaso sanguíneo.
Controlo de Fertilidade:	Dispositivo de oclusão inserido nas trompas de Falópio que expande mediante o calor ou a luz permitindo a esterilização permanente ou temporária.
Dispositivos de Captura	Dispositivos activados pela luz de diferentes formas, que permitem a captura de concreções nas cavidades do rim, pâncreas ou vesícula biliar.
Arcos ortodônticos	Arame para a correcção de dentes desalinhados. A recuperação de forma cria uma força que orienta o dente para a posição pretendida.
Preenchimento do estômago no tratamento da obesidade	Dispositivo que se desdobra no estômago, aumentando de volume e promovendo a saciedade do paciente.

Em 2002, Lendlein et al. demonstrou que os polímeros de memória de forma podiam ser usados como suturas de auto ajuste de modo a que as cirurgias fossem menos invasivas. Assim, o polímero de memória de forma era deformado na forma de fio de sutura alongado. Posteriormente, quando fosse efetuada a sutura, o fio seria colocado sem aperto, para que, a recuperação da forma do fio de sutura fosse desencadeada pelo calor do corpo humano, sem intervenção externa, levando ao encolhimento e aperto do fio, conforme figura seguinte (figura 2.2). A natureza do material polimérico pode ser convenientemente utilizada para incorporar funcionalidades adicionais, tais como a biodegradabilidade, o que elimina a necessidade da remoção do fio de sutura.

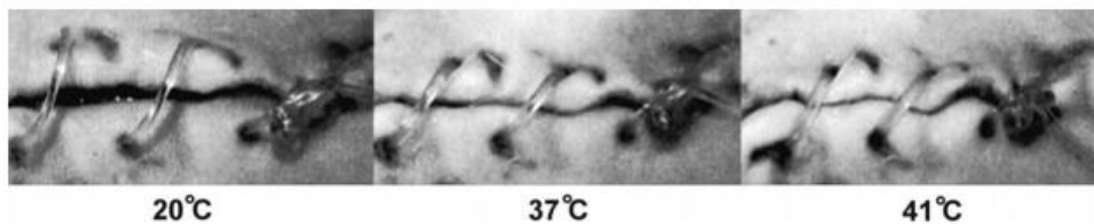


Figura 2.2 - Suturas de polímero de memória de forma, com auto ajuste [37]

2.2 Aplicações de biopolímeros em próteses 3D

Segundo Hutmacher, uma prótese deve verificar os seguintes critérios: (1) ser biocompatível, em que a degradação/reabsorção é controlada, e existe correspondência entre o crescimento (celular/tecido) *in vitro/vivo*; (2) deve possuir uma superfície cujas propriedades químicas proporcionem uma adesão celular; (3) deve ter uma estrutura 3D, bem como ser altamente porosa (para promover o crescimento celular, o transporte de nutrientes e o desperdício metabólico); (4) deve possuir as propriedades mecânicas correspondentes. Para a fabricação deste tipo de próteses vários processos podem ser usados, sendo a impressão 3D uma solução bastante efectiva [38].

2.2.1 Próteses brônquicas

A estenose traqueal ocorre maioritariamente na sequência de complicações derivadas de intubação ou traqueostomia, podendo também verificar-se devido a problemas congénitos ou tumores define-se pelo estreitamento anormal da traqueia, resultando numa obstrução parcial ou total das vias aéreas, apesar de, em alguns casos, se constatar esse estreitamento em mais que um local, é mais comum existir apenas num só sítio. [39]

Após confirmação de que, ressecções traqueais não poderiam vir a ser realizadas aquando uma dimensão da excisão superior a 2 cm, por estudos realizados no início do séc. XIX e em meados do séc. XX começou a ser investigada a possibilidade de utilização de próteses. Nos anos 60, investigações experimentais levaram à conclusão

de que, aproximadamente, metade da traqueia humana poderia ser removida cirurgicamente e apta a reanastomose, embora o limite da percentagem da traqueia removida variasse consoante a idade, anatomia local, patologias e cuidados anteriores [40].

Quando não era possível uma remoção e reconstrução com segurança, utilizar-se-ia uma prótese traqueal sólida, no entanto posteriores complicações eram verificadas, como eventuais estenoses, granulação, infecção crónica ou deslocação da mesma. Uma das soluções foi dotar a prótese com uma estrutura porosa, de maneira a permitir o crescimento do tecido conector, incorporando a prótese no local da traqueia, no entanto as mesmas complicações continuavam a verificar-se. As tentativas mais promissoras foram feitas de silicone, como a prótese Neville, apesar de granulomas na linha de sutura se manterem como uma complicação a ser resolvida endoscopicamente [41][42].

Endopróteses de silicone estão disponíveis nas mais variadas formas e dimensões. Alguns exemplos são demonstrados na figura 2.3. O tubo em T apresenta a vantagem de preservar a permeabilidade da via aérea superior enquanto a secção lateral se encontra fechada, mantendo o fluxo translaringeal de modo a promover humidificação, filtração e o aquecimento do ar inspirado, bem como preservando as propriedades vocais. Este tubo não provoca lesões na parede traqueal e pode ser mantido durante vários anos. Destaca-se também o tubo em Y, outro tipo de prótese em silicone, caracterizado pela remoção do ramo lateral externo, enfatizando a bifurcação em Y. Por último, salientam-se as próteses Dumon que possuem protuberâncias na sua superfície externa a 90°, de maneira a prevenir a deslocação da mesma [43]

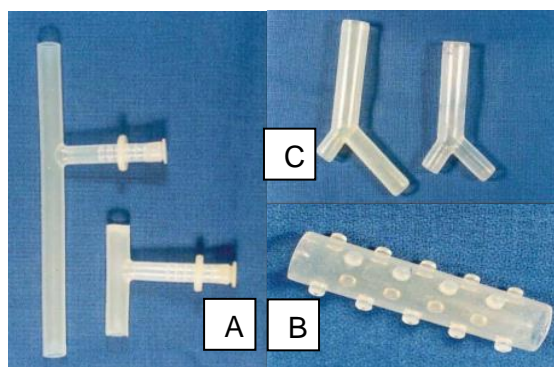


Figura 2. 3 – Próteses de silicone: (a) Tubo em T de Montgomery; (b) tubo em Y; and (c) prótese de Dumon [43]

Os modelos metálicos autoexpansíveis, como demonstrado na figura 2.4, são colocados com maior facilidade. Contudo a sua remoção pode dar origem a complicações graves. Normalmente, estas próteses são feitas de liga de níquel e titânio e podem ser revestidas por uma camada fina de silicone. São uma evolução em relação as próteses de silicone habituais devido á baixa força radial e acomodação aos contornos irregulares da traqueia hospedeira. Contudo, este tipo de próteses representa complicações frequentes que incluem migração ou crescimento de tecido entre os orifícios da malha metálica. Isto pode conduzir ao bloqueio da via aérea devido a acumulação de muco e ao consequente desenvolvimento de infecções bacterianas. É, portanto, necessária um evolução nesta área no sentido de colmatar os problemas das próteses actuais.

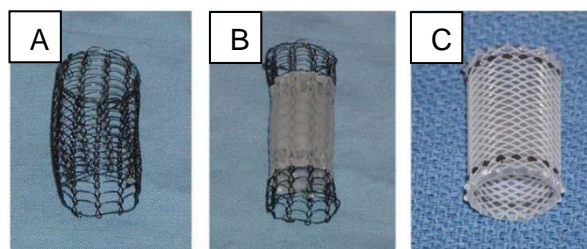


Figura 2.4 – modelos metálicos autoexpansíveis: (a) Metallic uncoated stent (Ultraflex); (b) modelo metálico autoexpansível com revestimento de silicone (Ultraflex); (c) prótese com reforço de silicone (Polyflex) [44]

Estudos recentes introduziram o uso de impressão artificial a três dimensões no âmbito desta investigação, ao utilizarem um modelo traqueal de poliprolactona revestido com células estaminais. Foram obtidos bons resultados na utilização de homoenxertos do pericárdio e da artéria aorta. Homoenxertos e aloenxertos são ambos transplantes de órgãos ou tecidos de um indivíduo para outro da mesma espécie, sendo que o último especifica que os indivíduos possuem diferentes genótipos [45][46].

Hoje em dia, a anastomose directa considera-se como a melhor opção, apesar da reconstrução prostética se manter como a metodologia primária no tratamento de lesões de maior dimensão. Esta abordagem utiliza o próprio tecido bronquial do paciente enquanto ainda não foi desenvolvida uma prótese exógena ideal. Esta prótese, idealmente, seria impermeável ao ar, com a consistência adequada a prevenir o seu colapso, não provoca resposta inflamatória, permite o crescimento do epitélio respiratório e é resistente a fibroblastos e a invasões bacterianas.[40] [47]

2.2.2 Impressão 3D na Engenharia Biomédica

A impressão 3D implica diversas aplicações na área da saúde, onde os seus produtos já se encontram em uso neste momento: em neurocirurgias, cirurgias de ortopedia e maxilo-facial, engenharia de tecidos, fabricação indirecta de dispositivos médicos, cirurgia cardíaca. Esta técnica pode ser aproveitada para imprimir directamente o implante final, entre outros propósitos [48].

Também existe o mercado da impressão 3D no contexto do estudo de casos mais complexos e difíceis de visualizar, bem como o ensino de estudantes e pacientes e até na formação de profissionais de saúde em determinados procedimentos. Estas oportunidades derivam da existência de certos procedimentos cirúrgicos tão complexos que exigem uma certa orientação e apoio, que podem ser complementados com o fabrico de modelos anatómicos para apoio do pré-cirúrgico. Isto pode evitar danos a partes essenciais do corpo considerando que o apoio existente actualmente consiste na utilização de radiação ionizante em quantidades consideráveis, o que leva ao aumento do tempo da cirurgia em si [48].

De maneira a reparar lesões físicas derivadas de outras terapias, nomeadamente defeitos anatómicos provocados por próteses customizadas, existe uma necessidade premente de objectos impressos a 3D com elevadíssima especificidade e excelentes propriedades [48].

Recorrendo ao uso desta tecnologia foi possível solucionar traqueomalacia (falta de resistência da traqueia, generalizada ou localizada, traduzindo-se numa diminuição do diâmetro ântero-posterior da traqueia, ao passo que o diâmetro transversal se pode manter normal) em crianças, através de uma prótese cilíndrica de PCL(policaprolactona) colocada no local (figura 2.5), em que as paredes da via aérea foram suturadas à prótese permitindo a expansão da via, bem como evitando pressões externas [49].

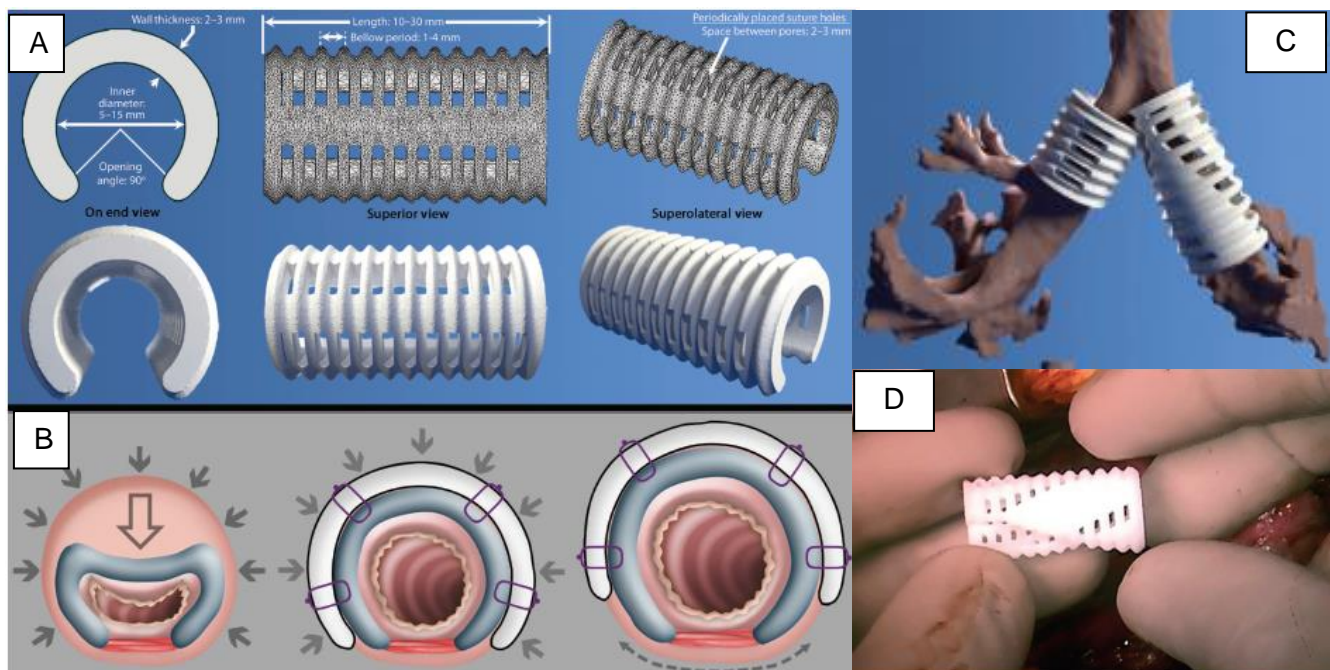


Figura 2.5 – prótese de impressão 3D par solucionar traqueomalacia em crianças: (a) modelo 3D em formato .stl; (b) mecanismo de acção da prótese; (c) projecção 3D da aplicação da prótese; (d) impressão 3D final [49]

2.2.2 Impressão 3D por extrusão de pastas

Extrusion Printing trata-se de uma técnica de manufatura cumulativa que pode ser utilizada no processamento de materiais pastosos em formas específicas tridimensionais. Os hidrogéis, por exemplo, são materiais particularmente importantes e são frequentemente processados através desta técnica [29][30]. Quando comparada directamente com técnicas convencionais de processamento como moldagem, a impressão 3D traz melhores resultados na criação de objectos complexos.

Neste tipo de impressão, o material é depositado num reservatório e depois pressionado continuamente através de um bocal de tamanho apropriado. Um fio contínuo de material é então posicionado na superfície da impressora. O objecto é então formado por movimentos pré-determinados do bocal, dispondo o material em diversas camadas sucessivas. As propriedades reológicas do material determinam a sua fluidez e capacidade de manter a forma [50].

Alguns dos hidrogéis adequados para este tipo de impressão são PEGDA (poli(etilenoglicol)) alginato. Estes materiais, entre outros, têm vindo a ser utilizados no

desenvolvimento de válvulas da aorta, estruturas anatómicas à base de cartilagem como, por exemplo, orelhas e na angiogénese artificial [51].

Mannoor et al. utilizou este método para criar uma orelha biónica recorrendo a uma mistura de alginato numa matriz de condrócitos (células presentes no tecido cartilaginoso) recorrendo à infusão de nanopartículas de prata (figura 2.6). Esta orelha biónica detém uma capacidade superior que a orelha humana, no que toca à captação de frequências de rádio [52].

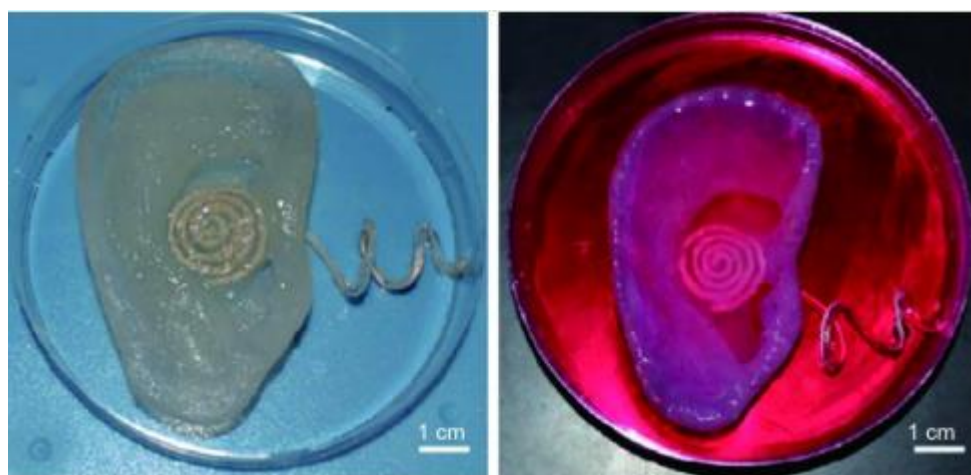


Figura 2.6 – Orelha biónica [52]

Contudo, apesar do progresso alcançado, quando se utilizam hidrogéis neste tipo de impressão, ainda existe uma certa dificuldade em criar objectos com uma altura significativa. Habitualmente, estes objectos têm apenas alguns cm de altura devido ao elevado stress a que estão sujeitos no processo de impressão, face à sua, relativamente, fraca estabilidade mecânica, resultando num material viscoelástico suave que não possui a capacidade de se autosuportar durante o processamento [51].

3. Métodos e Materiais

Este trabalho reflete o estudo de um composto polimérico que após impressão fosse bastante flexível, mas adquirisse uma resistência mecânica elevada em contacto com uma solução aquosa simulando biofluidos. Assim o procedimento experimental consistiu numa primeira etapa no desenvolvimento dum polímero que mantivesse a forma ao ser extrudido e para isso variou-se a sua composição. Numa segunda etapa, foi testada a impressão 3D e por último realizaram-se os testes de biocompatibilidade e de propriedades mecânicas em função do meio a que o material foi sujeito.

3.1 Desenvolvimento da mistura polimérica

O composto polimérico testado é formado por uma solução de PVDF com DMF, combinado ou não com o tricálcio fosfato na fase beta (β -TCP).

Mistura 1: PVDF : β -TCP = 2,5:1 em 6 ml de DMF. Os reagentes foram misturados, e dissolvidos no DMF homogeneizando a mistura com um agitador mecânico.

Procedeu-se a impressão de 4 amostras que foram expostas a 4 condições de evaporação de solvente:

- **Amostra 1A** – a amostra foi colocada dentro de uma caixa petri (4 dias);
- **Amostra 1B** – a amostra foi colocada em água dentro duma caixa de petri (4 dias);
- **Amostra 1C** – a amostra foi colocada dentro de uma camara de temperatura controlada (40°C), durante 24h;
- **Amostra 1D** – a amostra foi colocada dentro de água 24h, e posteriormente colocada dentro da camara de temperatura (40°C) durante 24h.

Após realização destes testes conclui-se que a fase mais maleável deste material (fase em que não entra em contacto com água ou está exposto a temperatura), pode ser severamente citotóxico. Assim, decidiu-se alterar um pouco a morfologia do material, partindo por uma mudança no solvente. No seguimento deste raciocínio foi desenvolvida uma segunda mistura, **Mistura 2**.

Mistura 2: PVDF : β -TCP = 2,5:1 em 6ml de solução obtida pela mistura de DMF e DMSO, variando a quantidade de cada um. A mistura foi obtida e homogeneizada de acordo com o procedimento referido na **Mistura 1**.

- **Amostra 2A** - 30%/70% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxidade de imediato.
- **Amostra 2B** - 30%/70% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;
- **Amostra 3A** - 40%/60% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxidade de imediato.
- **Amostra 3B** - 40%/60% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;
- **Amostra 4A** - 50%/50% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxidade de imediato.
- **Amostra 4B** - 50%/50% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;

3.2 Impressão 3D

A impressora de extrusão utilizada é *custom made* (figura 3.1), e pertence ao laboratório onde o estudo foi realizado, no Departamento de Ciências dos Materiais da FCT-UNL.

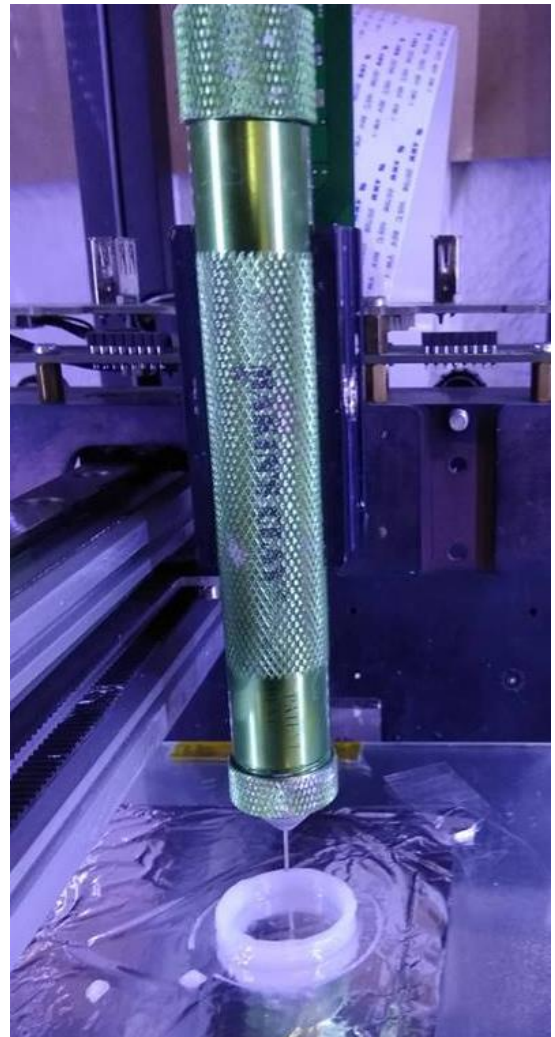


Figura 3.1 – Impressora de Extrusão *custom made*, Departamento de Ciências dos Materiais, FCT-UNL

As condições de impressão variaram num intervalo de temperaturas entre os 20°C e os 26°C, sendo que a humidade em todo o tipo de testes e amostras reproduzidas variou entre 50% a 60%. A pasta é extrudida através de uma seringa de 2ml, que condiciona diretamente o tamanho das amostras que são possíveis imprimir. A utilização de uma seringa com esta capacidade é imperativa, pois é o tamanho máximo suportado pela impressora.

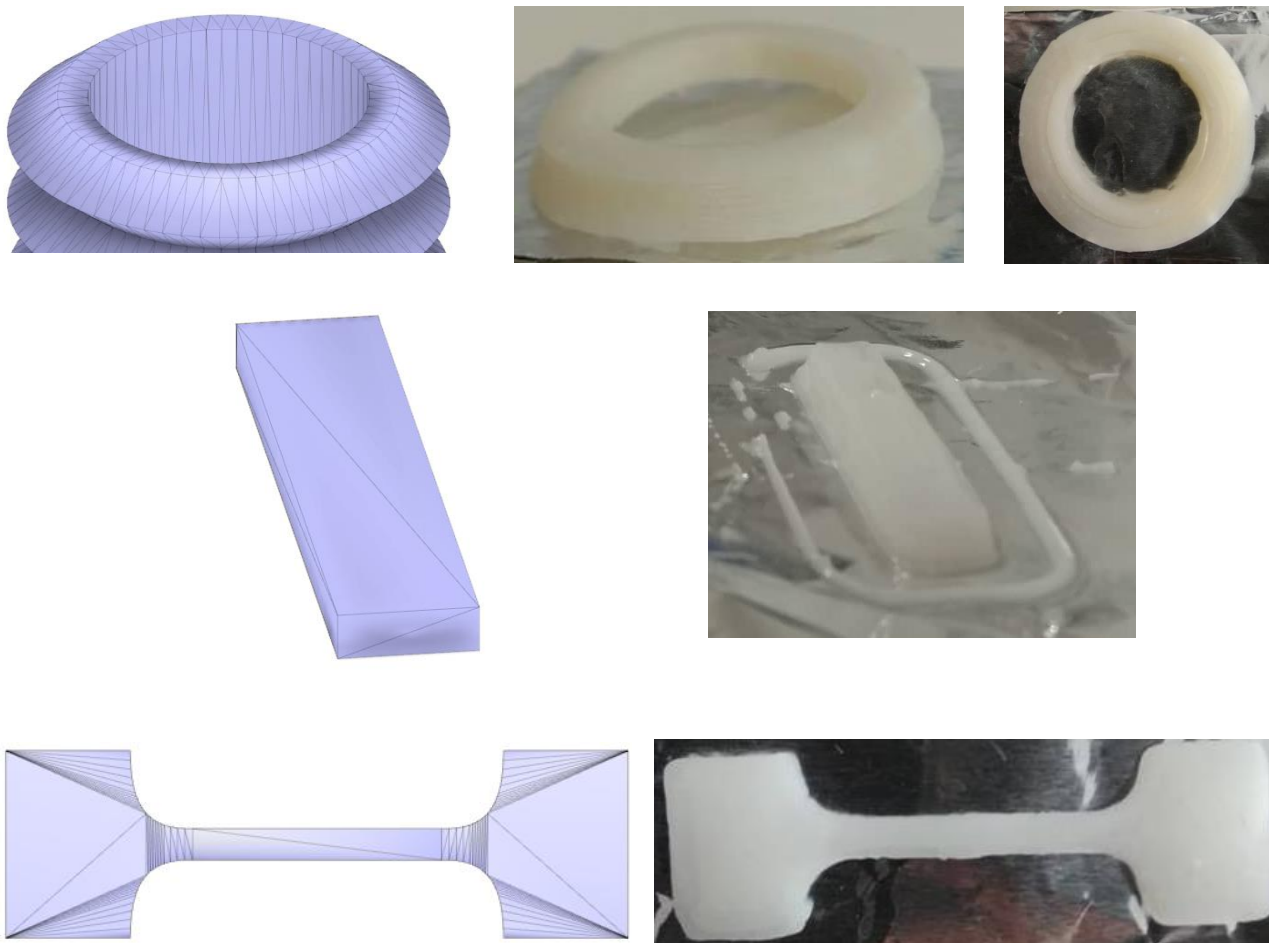


Figura 3.2 - modelos 3D, de teste, em formato .stl e respectivas impressões

3.3 Caracterização

3.3.1 Propriedades Mecânicas

Na fase mais flexível as amostras foram testadas após as amostras estarem apenas expostas ao ar, sendo que para a fase mais rígida as amostras foram expostas ou não a temperatura e submersas em SBF (*simulated body fluid*), com concentração iônica semelhante ao do plasma sanguíneo humano [53].

Para o estudo da influência dos solventes e da submissão das peças a diferentes meios nas propriedades mecânicas foram realizados provetes com geometria específica para

ensaios de tração. A figura 3.3 mostra um desses provetes cujas dimensões são 40 mm de comprimento, 2 mm de espessura, 12 mm de largura nas pontas e 2 mm de largura no meio.

Os ensaios consistem na aplicação de uma carga uniaxial crescente a um provete de teste (figura 3.3) com geometria adequada ao aparelho utilizado e ao material em si, enquanto que ao mesmo tempo são medidas as variações no comprimento.



Figura 3.3 – Exemplo de provete impresso na impressora 3D, utilizado nos Testes de Tração, as duas pontas do provete foram concebidas no formato apresentado para existir superfície de tracção nas garras

Para realizar este estudo foi utilizado uma máquina de tração Rheometric Scientific, produzindo uma força de 20N a uma velocidade de 10mm/min, longitudinalmente (sentido perpendicular à deposição das camadas da amostra).

A partir das medidas de cargas e os respectivos alongamentos, constrói-se a curva tensão-deformação, como mostra a figura 3.4, a qual mostra essa relação para diferentes tipos de polímeros.

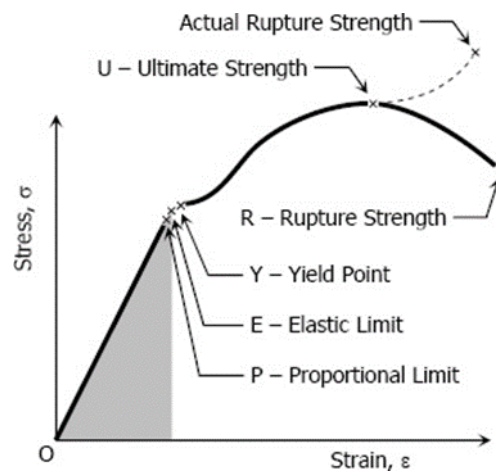


Figure 3. 4 – Gráfico de tensão versus deformação [34]

A análise deste gráfico permite que seja calculado o módulo de elasticidade ou módulo de Young. O módulo de elasticidade é medido pela razão entre a tensão e a deformação relativa, dentro do limite elástico, em que a deformação é totalmente reversível e proporcional à tensão.

$$\epsilon = \sigma / D = \frac{\Delta F / A}{\Delta x / L}$$

Em que:

- ϵ = módulo de elasticidade;
- σ = tensão;
- D = deformação;
- ΔF = força aplicada longitudinalmente ao provete;
- A = área de secção transversal do provete;
- L = comprimento do provete na distância entre as garras;
- Δx = deformação.

3.2.1 Ensaaios de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi testada através da utilização de células do tecido epitelial do rim do macaco verde africano, células Vero. As culturas de células foram efectuadas em placas de 96 poços no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e mantidas na incubadora a 37°C. De maneira a facilitar a contagem celular, foi também utilizada uma solução Azul de Tripán (0.4%, Gibco®, Invitrogen™).

Os testes de citotoxicidade foram desenvolvidos através do método do extracto. Em primeiro lugar, esterilizaram-se as amostras submersas em 2mL de etanol 70% (v/v) durante 10 min.

De seguida, as células foram sujeitas a tripsina e, portanto, suspensas. A tripsina é uma enzima capaz de quebrar as ligações entre os aminoácidos das proteínas intercelulares responsáveis pela sua aderência a determinadas superfícies, provocando a sua suspensão. Prepararam-se os extractos através do contacto entre as amostras e o meio de cultura durante (100 mg de material por ml de meio de cultura, sem células).

Adicionou-se 10% de soro ao extracto, sendo que durante 24 horas a 37°C colocam-se os extractos a incubar, de acordo com a norma ISSO 10993-5. O controlo negativo corresponde a células em meio completo normal. Já o controlo positivo (citotóxico), consiste em células em meio de cultura ao qual foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Este composto é citotóxico e leva à morte celular.

De maneira a realizar o teste da viabilidade, os meios foram aspirados e suplementou-se o meio com resazurina no seguinte modo: 50% de solução de resazurina a 0,04mg/mL em PBS para 50% de meio de cultura completo. Após o período de incubação, o meio é transferido para a leitura da respectiva absorvância. A relação entre esta e a absorvância do controlo permitem-nos calcular a população celular relativa. Os resultados obtidos levam-nos à caracterização da citotoxicidade do extracto consoante os dados da tabela 3.1 [54].

Tabela 3.1 – Classificação qualitativa da viabilidade celular relativa

Citotoxicidade	Viabilidade celular relativa / %
não citotóxico	≥ 90
levemente citotóxico	80 a 89
moderadamente citotóxico	50 a 79
severamente citotóxico	< 50

A resazurina, habitualmente disponível como um sal de sódio, trata-se de um corante azul não fluorescente utilizado como indicador de pH e de viabilidade celular. Este composto é reduzido a resorufina na mitocôndria das células metabolicamente activas, transformando-se numa molécula cor-de-rosa e fluorescente. Deste modo, este processo permite distinguir as células viáveis de inviáveis. A reduzida citotoxicidade da resazurina representa uma grande vantagem na determinação da viabilidade celular face a outros métodos existentes. Neste trabalho experimental, a concentração da solução de resazurina é de 0,2mg/mL e o solvente utilizado foi PBS (Phosphate Buffered Saline).

A variação da absorvância permite determinar a alteração de cor do meio. Essa discrepância é directamente proporcional ao número de células viáveis presentes. O gráfico seguinte ilustra os espectros de absorvância da resazurina e da resorufina (picos de absorvância aos 601 e 571 nm, respectivamente).

Considerando a sobreposição dos espectros da resorufina e da resozurina, é necessário efectuar duas correcções aos resultados de maneira a obtermos uma informação quantitativa viável da reacção em estudo. Primeiro, há que subtrair a absorvância medida a 600 nm (DO600) à absorvância medida a 570 nm (DO570). Esta subtracção aplica-se a todos os poços, mesmo que não manifestem a presença de células viáveis (trata-se do controlo de meio, que designaremos por DOCM570 e DOCM600).

De maneira a ser efectuada uma análise estatística, cada medida foi feita em triplicado. Calculou-se a média dos valores de DO570 - DO600 e o respectivo desvio padrão (σ). Fez-se o mesmo para o controlo de meio: foi calculada a média dos valores DOCM570 - DOCM600 bem como o desvio padrão correspondente (σ_{CM}).

Aos valores obtidos no passo anterior para os poços com células, foi subtraído o valor médio para o controlo de meio, resultando em: (DO570 - DO600) - (DOCM570 - DOCM600).

Calculou-se também a incerteza, Δ , através dos desvios padrão:

$$\Delta = \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{CM}^2}$$

Por fim, foi construída a curva de calibração da resazurina com representação das incertezas associadas.

Dizer que não foram testadas amostras que tenham estado em contacto com a água da **Mistura 2**, pois os resultados obtidos pelos testes de citotoxicidade da **Mistura 1**, permitiram verificar que as amostras depois de estarem em contacto com a água não são citotóxicas.

4. Análise de Resultados e Discussão

Neste capítulo apresenta-se a análise dos resultados obtidos no decorrer deste estudo, desde a optimização da mistura polimérica, a análise dos resultados dos testes mecânicos de tração, bem como os testes de citotoxicidade, e finalmente a demonstração de impressão 3D para uma possível prótese.

4.1 Desenvolvimento da mistura polimérica

Tendo em vista a obtenção de uma mistura polimérica que apresentasse duas fases, uma mais flexível que permita o seu enrolamento mantendo contudo a forma original, e outra que desse origem a uma elevada rigidez permanente do material. A mistura de PVDF e β -TCP foi a opção escolhida por não ter sido ainda testada na literatura. No entanto o solvente mais utilizado e que dá maior rigidez ao PVDF após evaporação é o DMF o qual é bastante citotóxico. Assim, testaram-se várias amostras em que este solvente foi utilizado e foi testada uma mistura de DMF com DMSO (este muito menos tóxico mas após evaporação as peças de PVDF ficam mais flexíveis),

Após várias variações da constituição da mistura, obteve-se uma mistura polimérica de constituição homogénea, com características que à partida indicavam serem promissoras para dar continuidade do projecto. **Mistura 1** em que a relação PVDF e β -TCP é de 2.5, misturado com 6 ml de DMF.

Verificou-se neste estado inicial do estudo que o polímero obtido era bastante flexível, sendo possível, recorrendo a uma agulha de distribuição cónica (0.7 mm) fazer uma extrusão manual, simulando a extrusão recorrendo à impressora 3D (figura 4.1). Este após extrudido, tinha capacidade para manter uma estrutura definida aquando a sobreposição de camadas. Com o passar do tempo (horas), este endurecia por si só devido à evaporação do DMF.



Figura 4.1 – Extrusão manual com recurso a agulha de distribuição cónica 0.7mm (a) amostra sem estar em contacto com água (b) amostra que esteve em contacto com água.

Na figura anterior (figura 4.1), apesar de disposição de camadas não ser no mesmo formato, foi possível verificar ao tacto uma diferença muito grande na rigidez/robustez do material. Tendo em conta as diferenças de luminosidade das duas fotografias é possível verificar também uma diferença no tom de cor da amostra, passando de uma aparência quase transparente para branca. Esta é também uma característica que indica que o solvente evaporou e ficou apenas ou maioritariamente o PVDF.

Tendo em conta as duas diferentes fases na morfologia do polímero, a fase em que este está em contacto com água (fase rígida, figura 4.1(b)) e não (fase flexível, figura 4.2(a)), sabendo que a solução através da qual era obtida a mistura, continha DMF, que é um composto tóxico, seria essencial fazer um estudo sobre a quantidade de solvente que permanecia ao longo do tempo nas duas fases em específico. Uma vez verificada a sua possível impressão recorrendo à impressora 3D, e antes de avançar para esta segunda etapa do desenvolvimento de uma prótese viável, decidiu-se então submeter este material aos testes de citotoxicidade.

4.2 Testes de Citotoxicidade

As amostras, obtidas recorrendo à mistura 1, submetidas ao teste de citotoxicidade foram as seguintes:

- **Amostra 1A** – a amostra foi colocada dentro de uma caixa petri (4 dias), a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C);
- **Amostra 1B** – a amostra foi colocada em água dentro duma caixa de petri (4 dias);
- **Amostra 1C** – a amostra foi colocada, durante 24h dentro de uma camara de temperatura controlada (40°C);
- **Amostra 1D** – a amostra foi colocada dentro de água 24h, e posteriormente colocada dentro da camara de temperatura (40°C) durante 24h.

Tabela 4.1 – Resultados dos testes de citotoxicidade, recorrendo ao método do extracto das amostras concebidas através da *Mistura 1*.

Nº de diluições	1A - viabilidade celular relativa/ %	1B - viabilidade celular relativa/ %	1C - viabilidade celular relativa/ %	1D - viabilidade celular relativa/ %
1	11±1	102±4	101±4	93±3
2	94±4	100±4	94±4	102±4
3	92±4	103±4	99±4	100±4
4	101±4	104±4	99±4	102±4

Analisando a tabela 4.1, foi possível classificar qualitativamente as amostras 1B, 1C, 1D como não citotóxicas, sendo que a amostra 1A foi considerada severamente citotóxica (tabela 3.1).

Os resultados permitiram concluir, em primeiro lugar que a combinação do PVDF com e β -TCP é viável ao nível da viabilidade celular.

As amostras que estiveram em contacto com a água (amostras 1B e 1D) revelaram possuir viabilidade celular, em particular o resultado da amostra 1B, em que foi possível verificar, que o DMF sendo este tóxico, já não estava presente na amostra. O propósito das condições a que a amostra 1D foi submetido, seria de alguma forma simular aquilo que são as condições finais para uma possível prótese, considerando a temperatura corporal a que a mesma poderia estar sujeita, fazendo o paralelo dos fluidos corporais com a água. Quanto à amostra 1C, exposta apenas a temperatura (40°C) verificou também a evaporação de uma grande percentagem do DMF presente na peça.

O resultado obtido permitiu verificar também, que a amostra 1A, exposta ao ar existente na caixa de petri e à temperatura ambiente do laboratório (representando a fase flexível com memória de forma do material), na primeira diluição é severamente citotóxica. Este facto deve-se à existência de solvente na amostra que não evaporou, sendo que na segunda diluição a amostra revelou ser não citotóxica, deixando ainda assim alguma margem de manobra para uma possível utilização futura desta solução exposta a estas condições.

Tendo em vista a possibilidade de aplicação numa prótese brônquica e a sua colocação através da cavidade bucal, a flexibilidade do material para o seu correto posicionamento é um fator primordial bem como a memória de forma. Face a esta contingência a mistura 1 não foi submetida a testes mecânicos.

No seguimento do referido anteriormente procedeu-se ao estudo da mesma mistura de PVDF e β -TCP com uma mistura de DMSO e DMF dado que o DMSO também dissolve o PVDF, sendo menos tóxico que o segundo. Deste modo, produziram-se diferentes amostras variando esta mistura de solventes, designada de **mistura 2**.

A variação entre DMF e DMSO estudada está indicada na tabela 4.2. Não se aumentou a percentagem de DMSO acima dos 80% na constituição do solvente pois parecia estar no limite duma consistência aceitável para o material. Não se aumentou a percentagem de DMF acima dos 60% pelo facto do objetivo ser obter a melhor consistência possível com a menor utilização possível de DMF.

Tabela 4.2 – Combinação na quantidade de DMF e DMSO usadas na mistura 2 mantendo a relação PVDF e B-TCP.

DMF (ml)	DMSO (ml)	% DMF/%DMSO	Observações
1,2	4,8	20/80	Pasta muito líquida
0,6	2,4	20/80	Pasta homogénea
1,2	1,8	40/60	Pasta homogénea
3	3	50/50	Pasta homogénea
1,8	1,2	60/40	PVDF não dissolvido na totalidade
2,4	1,6	60/40	Material granulado
3	2	60/40	Pasta homogénea

O objectivo principal desta etapa de estudo, seria paralelamente obter a mistura mais viável fazendo jus às características enunciadas anteriormente do material que se pretendia desenvolver, paralelamente ao menor uso possível de DMF devido à sua alta toxicidade.

Foi possível verificar de imediato, que quanto maior a percentagem de DMF existente na pasta, maior flexibilidade numa fase inicial e rigidez após a evaporação do DMF e do DMSO. A pasta obtida com a percentagem de 20%/80% (%DMF/%DMSO), apesar de homogénea revelou uma morfologia quebradiça. A 30%/70% foi testada posteriormente, com sucesso.

Na tentativa de extrusão manual utilizando uma agulha metálica de 0,5 mm, simulando a extrusão recorrendo à impressora 3D, foi possível verificar que esta tinha capacidade para manter uma estrutura definida aquando a sobreposição de camadas, ganhado rigidez ao estar em contacto com a água.

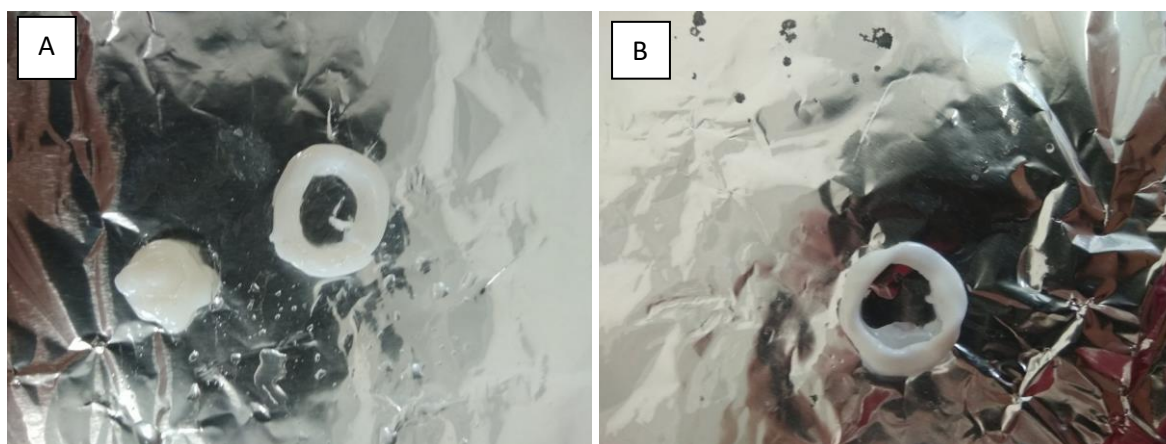


Figura 4.2 – Amostras da variação 30%/70% (%DMF/%DMSO) após 24h guardadas numa caixa de Petri (a); Amostras após 24h em contacto com água(b); Ambas através de extrusão manual com recurso a agulha metálica 0,5mm

Seguindo a mesma metodologia usada na mistura 1, e após o estudo efectuado anteriormente (rácio entre as percentagens de DMF e DMSO da solução) as várias variações da mistura 2 que foram submetidas ao teste de citotoxicidade estão apresentadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resumo dos 3 tipos de variação da mistura 2, submetidos aos testes de citotoxicidade

Amostra	DMF (ml)	DMSO (ml)	% DMF/DMSO
2	2,2	4,8	30/70
3	2,4	3,6	40/60
4	3	3	50/50

Para os três tipos de amostra resultantes da mistura 2, foram seleccionadas as seguintes condições de evaporação/libertação do DMF e do DMSO da amostra, para ser testada a viabilidade celular das mesmas:

- **Amostra 2A** - 30%/70% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxicidade de imediato, após produção.
- **Amostra 2B** - 30%/70% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;

- **Amostra 3A** - 40%/60% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxicidade de imediato.
- **Amostra 3B** - 40%/60% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;
- **Amostra 4A** - 50%/50% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste de citotoxicidade de imediato.
- **Amostra 4B** - 50%/50% (%DMF/%DMSO) submetida ao teste depois de estar exposta ao ar durante três horas;

Tabela 4.4 – Resultados dos testes de citotoxicidade, recorrendo ao método do extracto das amostras concebidas através das variações da *Mistura 2*, apresentando-se apenas os resultados da 1ª diluição.

Amostra	Viabilidade celular relativa / %
2A	83±3
2B	92±4
3A	64±4
3B	89±4
4A	29±4
4B	79±4

Ao analisar a viabilidade celular (tabela 4.4), tendo em conta o valor de referência, que é o controlo negativo, em que a viabilidade celular foi de 100±5% é possível concluir que todas as amostras que foram testadas imediatamente após a sua produção são citotóxicas, apesar da amostra 2A apresentar um resultado interessante. Este facto deve-se à presença do DMF e do DMSO nas amostras. Quanto às que repousaram três horas, a 2B e 3B evidenciaram um resultado positivo, como não citotóxicas. Já 4B revelou uma viabilidade celular mais baixa.

Para a interpretação destes dados é importante ter em conta o processo de esterilização das amostras antes de serem submetidas ao teste propriamente dito. As amostras estiveram cerca de 10 min em etanol a 70%, depois foi aspirado o etanol e deixado a secar na câmara de fluxo durante o fim de semana.

As amostras produzidas resultado da mistura 1 com a 2B e 3B, foi possível verificar na fase mais flexível (antes do polímero estar em contacto com água/SBF) que a memória de forma do material era parecida. Já na fase morfológica mais rígida (depois do contacto com água/SBF) a mistura 1 possuía nitidamente uma rigidez maior. Enquanto que as amostras, resultado da mistura 2, apresentaram ainda alguma memória de forma, no entanto era evidente uma perda desta característica em relação à primeira fase.

As impressões de teste realizadas recorrendo à constituição da amostra 2B apresentaram maior fragilidade pós impressão. Tendo em conta os objectivos principais deste estudo, decidiu-se prosseguir o mesmo recorrendo à solução que deu origem à amostra 3B.

4.3 Propriedades Mecânicas

Na figura 4.3, tentou-se mostrar a capacidade que o material (40%/60%) tem de voltar à sua configuração inicial. A sequência de fotografias é temporal da esquerda para a direita. Ambas as amostras foram ‘apertadas’ e soltas de seguida.

Na amostra que não foi exposta ao SBF (figura 4.3(a)), mesmo após forçar várias vezes o material a uma forma que não é a sua, quando se liberta, o mesmo volta ao seu formato inicial (última fotografia da sequência).

Quanto à que esteve submersa em SBF durante uma semana, apresentou uma resistência ao estímulo aplicado, ao ponto de não ser possível dobrá-la sobre si, sem a quebrar. Na imagem (figura 4.3(b)) é possível verificar a o formato com que a peça ficou.

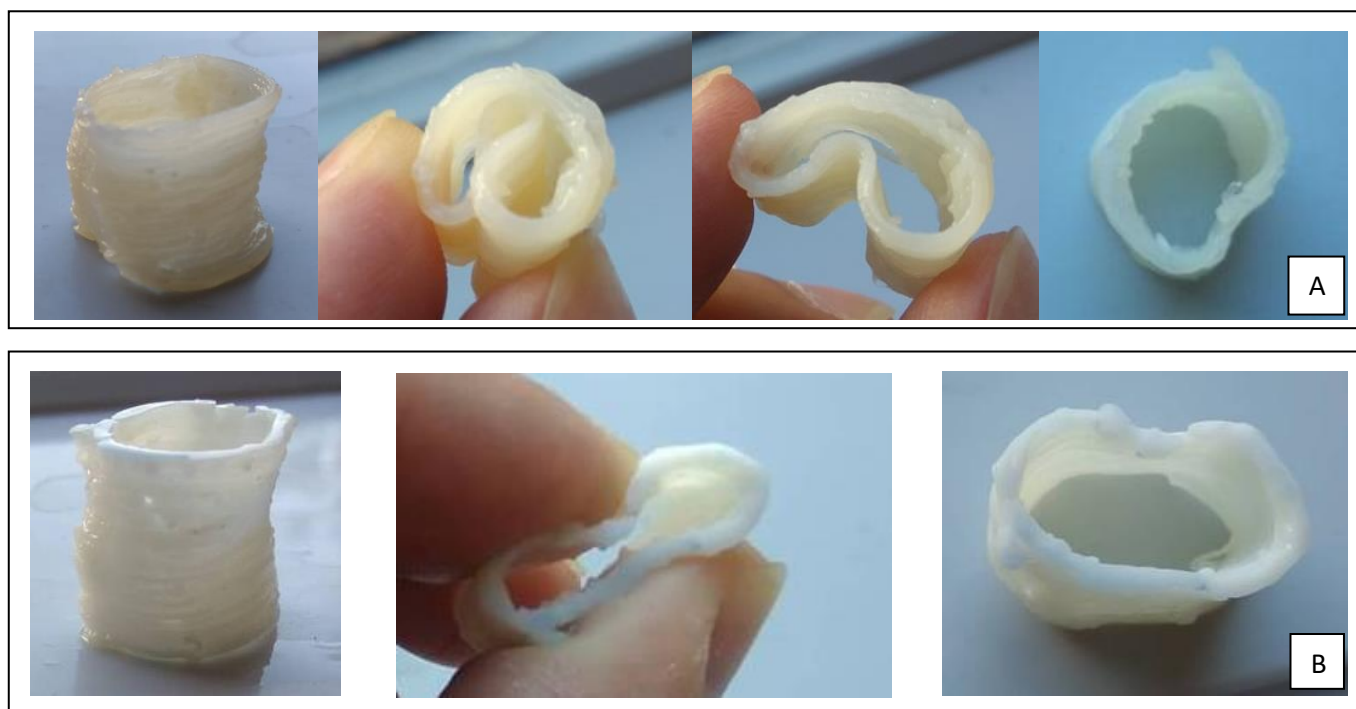


Figura 4.3 – forma do material impresso recorrendo à técnica de impressão 3D por extrusão: (a) amostra que não esteve em contacto com SBF; (b) amostra que foi exposta ao SBF (1 semana)

Nos ensaios de tracção, por questões de caracterização do material (com formulação igual à amostra 3B, foram preparados entre cinco a dez provetes de teste (figura 3.3) para cada uma das seguintes condições:

- Exposição ao ar 1h, 24h e 48h;
- Submersas em SBF 1h, 24h e 48h;
- Submersas em SBF e expostas a uma temperatura de 48°, 1h, 24h e 48h.

Dos ensaios mecânicos realizados determinou-se o módulo de elasticidade do material e ainda a tensão de ruptura (figuras 4.4 e 4.5). A tabela 4.5 e 4.6 apresentam os resultados obtidos. De salientar que os dados recolhidos para as amostras que foram submersas em SBF durante uma hora, não foram validados. Ocorreu uma falha no processo de fixação dos provetes, durante os testes, e os dados recolhidos eram incongruentes.

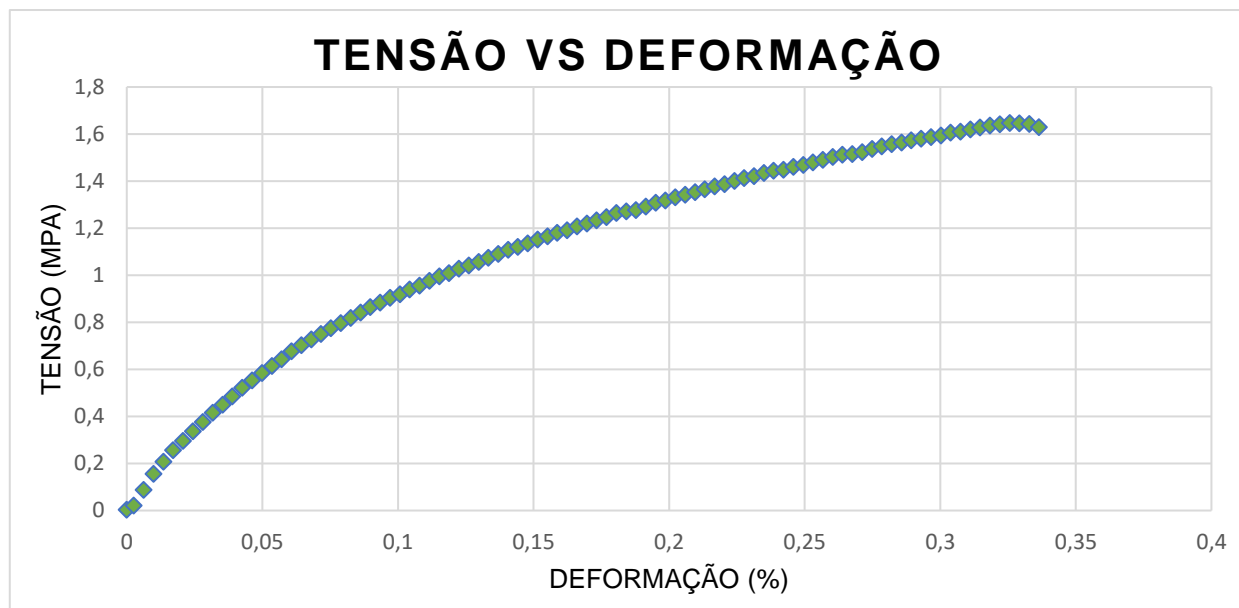


Figura 4.4 – Curva típica obtida nos ensaios de tracção (amostra exposta 24h ao ar)

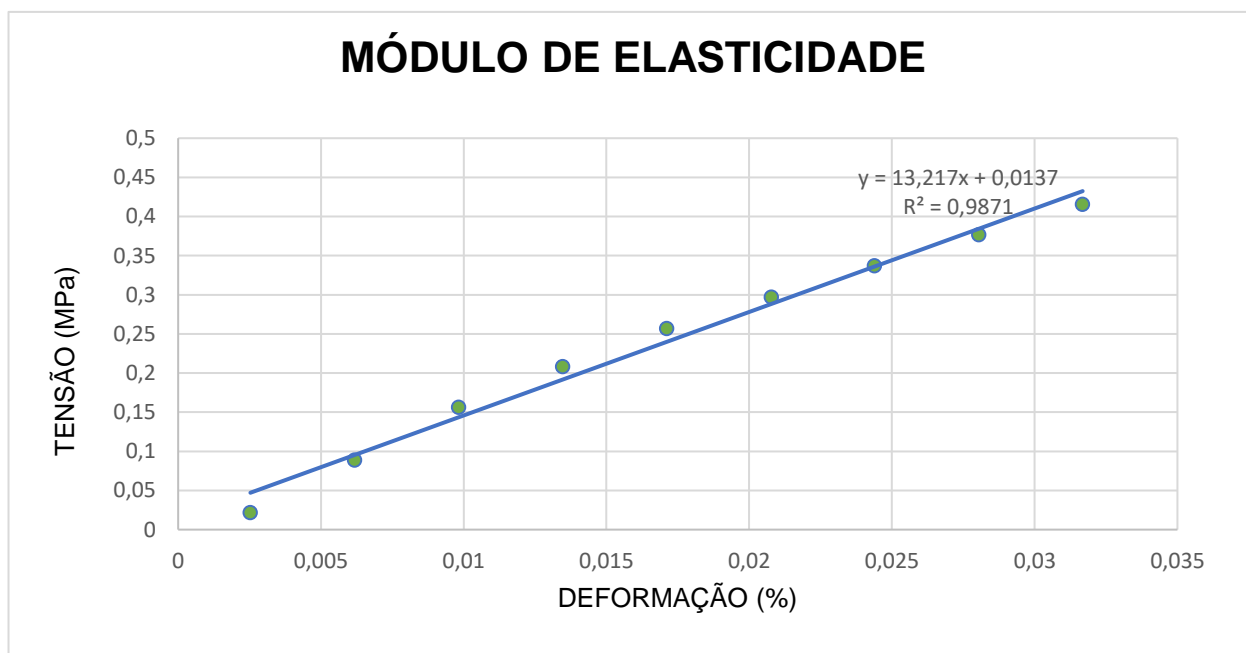


Figura 4.5 – Exemplo do cálculo do Módulo de Young através do gráfico anterior

Tabela 4.5 – Módulo de Young das amostras testadas; para cada variação foram testadas entre 5 a 8 amostras, sendo que o valor apresentado representa a média.

Ar			c/SBF			c/ SBF 38°		
1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)	1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)	1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)
9,4±1,6	9,9±3,1	12,0±0,9	-	24,1±1,6	27,0±0,19	29,4±5,1	31,5±1,9	34,2±5,2
Módulo de Young da cartilagem da traqueia humana: [12,2 ; 20,5] MPa [55]								

Tabela 4.6 – Tensão de ruptura das amostras testadas; para cada variação foram testadas entre 5 a 8 amostras, sendo que o valor apresentado representa a média.

Ar			c/SBF			c/ SBF 38°		
1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)	1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)	1h (MPa)	24h (MPa)	48h (MPa)
1,18±0,06	1,19±0,20	1,35±0,14	-	1,86±0,09	2,10±0,36	1,79±0,43	2,07±0,20	2,08±0,31

Na fase mais flexível do material (em que este não esteve em contacto com o SBF) verificou-se, dependendo do tempo em que este esteve exposto ao ar uma variação do Módulo de Young entre 9,4 e 12 MPa.

Já nas amostras que estiveram expostas a 38°C e ao SBF (fase mais sólida), foi possível verificar um aumento significativo no módulo de elasticidade para valores entre 29,4 e 34,2 MPa.

4.4 Teste de impressão de segmento de prótese

Partindo de um exame de tomografia computadorizada, obteve-se o modelo que dará forma à impressão, utilizando o software DICOM® (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) sendo posteriormente gravado em formato .stl (figura 4.6) e em G-code para que os parâmetros de impressão possam ser otimizados.

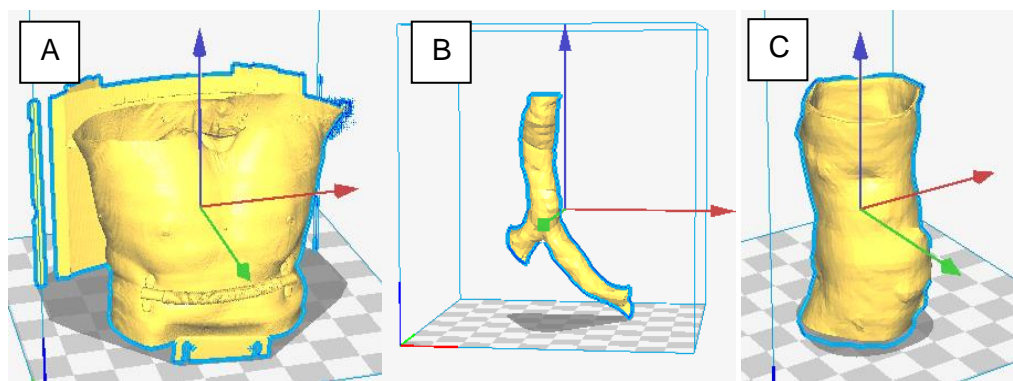


Figura 4.6 – modelos 3D em formato .stl de um paciente recorrendo a um exame de tomografia computadorizada: (a) modelo inicial; (b) modelo depois de algumas alterações; (c) modelo pronto para impressão [56]

À posteriori, o modelo pronto para impressão foi alterado, tendo em conta as particularidades do polímero a ser impresso, recorrendo-se ao *software* Autodesk® Fusion 360™ (figura 4.7 (a)). Este programa foi também utilizado para todos os testes necessários de modelos mais simples (figura 4.7 (b)), que permitiram a optimização da mistura no sentido de ser impressa a três dimensões.

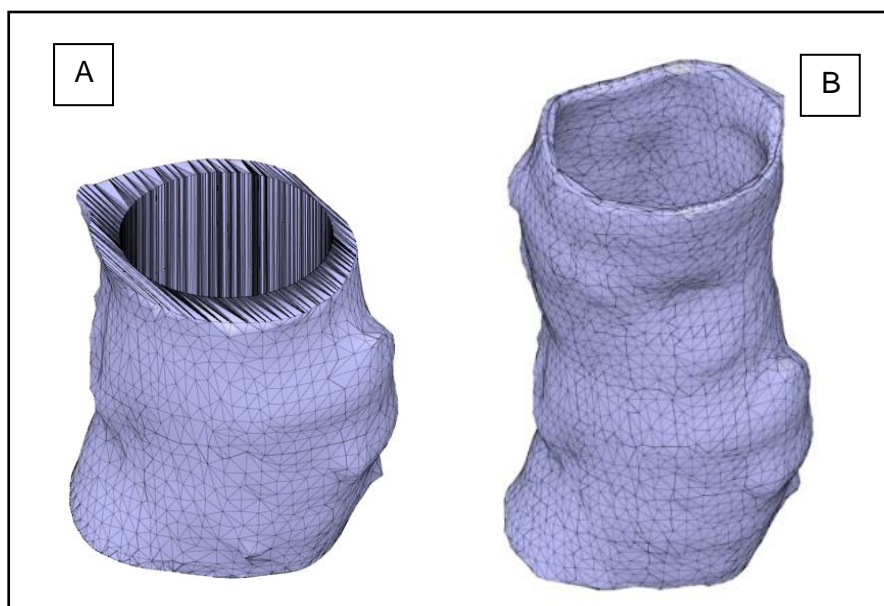


Figura 4.7 – (a) modelo 3D em formato .stl utilizado nas amostras finais do projecto; (b) modelo em estágio intermédio entre a recolha (tomografia computadorizada) e o modelo final

As tentativas de impressão deste modelo real estão apresentadas na figura 4.8. É importante referir que a impressão está condicionada (tamanho relativo da impressão) pela capacidade da seringa utilizada para extrusão (2ml), que é o tamanho máximo comportado pela impressora utilizada.

As impressões reproduzem o modelo obtido através da Tomografia Computorizada, após pequenas alterações na superfície exterior e interior. Na exterior utilizando um filtro com o objetivo de evitar algumas irregularidades, que iriam fazer com que a deposição das camadas não assentasse uniformemente e no interior um aumento da espessura em si, essencial para manter a peça hermética.

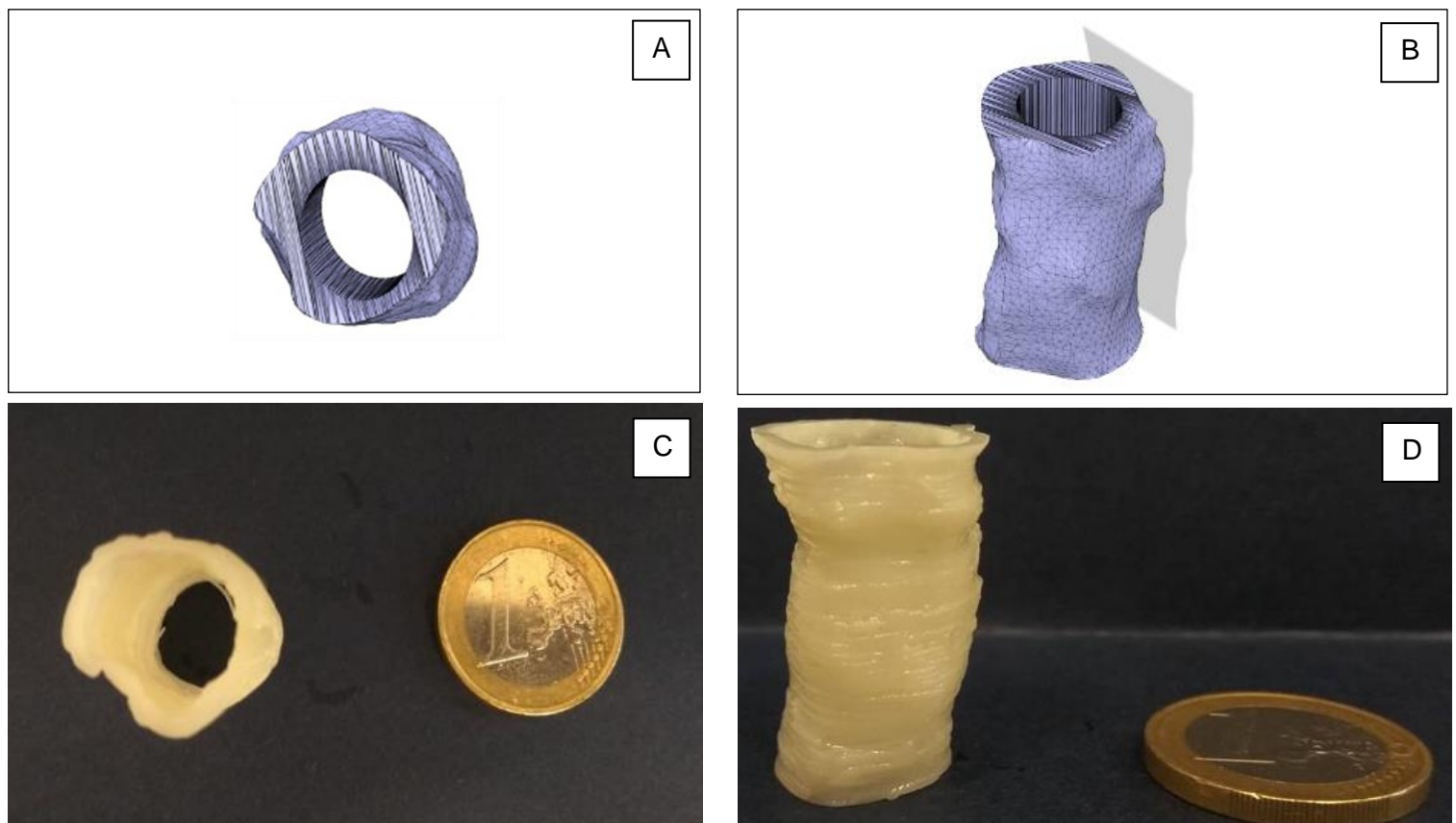


Figura 4.8 – modelo 3D em fomato .stl concebido através do *software* Autodesk® Fusion 360™(a)(b); Amostra de impressão 3D por extrusão, do ficheiro em formato .stl(c)(d)

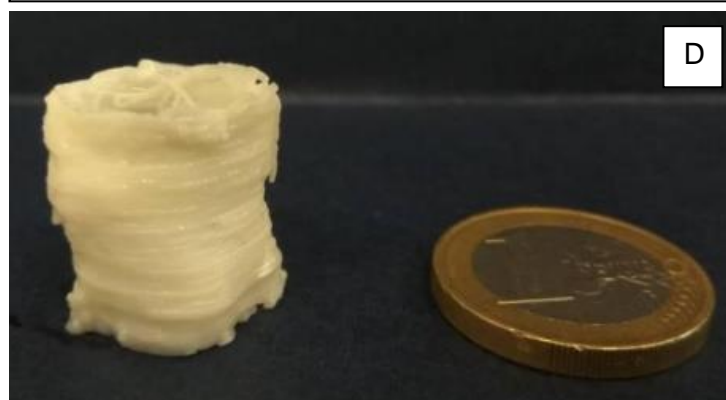
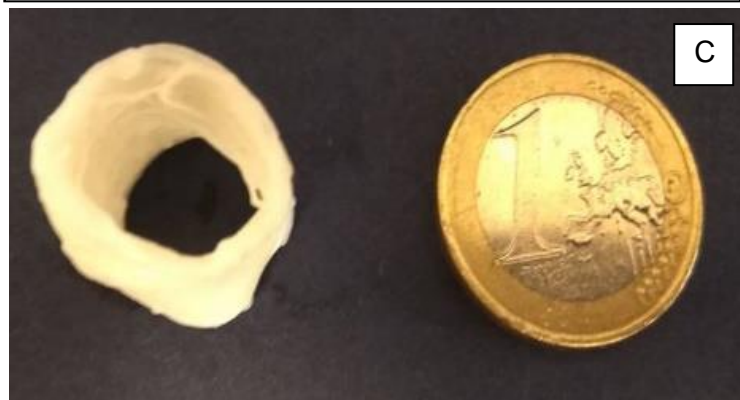
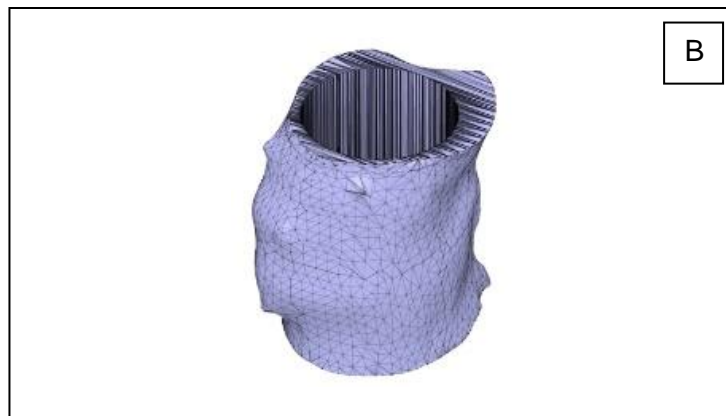


Figura 4.4 – modelo 3D em fomato .stl concebido através do software Autodesk® Fusion 360™(a)(b); Amostra de impressão 3D por extrusão, depois de estar em contacto com SBF durante uma semana, do ficheiro em formato .stl(c)(d)

5. Conclusão

O protocolo delineado para este estudo, permitiu a impressão de uma versão inicial de próteses customizadas da traqueia.

Verificou-se que o polímero otimizado para a impressão 3D (PVDF:B-TCP=2,5:1; 6ml de solvente), apresentou características morfológicas interessantes, apresentando duas fases morfológicas nitidamente diferentes. Uma quando estava exposto unicamente ao ar, e outra quando estava exposto a temperatura/SBF.

Os ensaios mecânicos permitiram verificar a viabilidade do material estudado para futuros desenvolvimentos. Comparando com a bibliografia, em particular com o estudo quem tem como título '*Investigation of the Mechanical Properties of the Human Tracheal Cartilage*', National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Iran, 2017. Este estudo apresenta como resultados do Módulo de Young, da cartilagem da traqueia, uma variação entre 12 e 20 MPa, dependendo do sexo, da idade e da zona da traqueia. O material na fase mais rígida, exposto à temperatura e ao SBF, apresentou valores entre 29 e 34 MPa [55].

A sua viabilidade celular foi comprovada, tendo em conta as particularidades em que a esterilização das amostras foi efectuada. A exposição do material ao etanol afecta, principalmente na fase mais flexível a morfologia do material (endurecendo-o).

O material estudado conseguiu reproduzir através da impressão 3D, a traqueia de um paciente obtida através de Tomografia Computorizada,

Considera-se que este estudo pode servir como base, para futuros desenvolvimentos numa prótese de traqueia. Apesar de ser um estudo original, sem similaridades algumas com a bibliografia pesquisada, algumas barreiras foram ultrapassadas no sentido de obter uma prótese da traqueia viável.

Antes de se avançar para qualquer tipo de melhoramentos na mistura, penso que se devia estudar primeiramente a porosidade do material, para verificar se é a adequada ao objectivo final, bem como testes de compressão, para uma caracterização mais completa das propriedades mecânicas.

Testes ao efeito do álcool (método de esterilização para os ensaios de citotoxicidade) na mistura devem ser realizados, ou outra maneira de esterilização das amostras deve ser tida em conta, tais como a utilização de um fungicida ou até o recurso a irradiação UV.

Tendo em conta as patologias associadas à traqueia, em que esta prótese seria útil, uma funcionalização do material com nanopartículas que possam intervir/influenciar no seu combate seria uma abordagem futura interessante.

6. Referências

- [1] Guelcher, S.; Hollinger, J.; *An Introduction to Biomaterials*; CRC Press, 2006
- [2] Ratner, B.D.; Hoffman, A.S; Schoen, F.J.; Lemon, J.E. EDs; "Biomaterials Science"; Academic Press, Orlando, 1996.
- [3] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, D. Hui," 3D printing of polymer matrix composites: a review and prospective, *Comput".-Aided Des. Compos. Part B* 110 (2017) 442–458.
- [4] Black, J. "Performance of Materials Fundamentals of Biocompatibility. New York: Marcel Dekker, 1992..
- [5] Williams, DF; Cunningham, J; *MAterials in CLinical Dentistry*"; Oxford, UK: Oxford University Press, 1979.
- [6] Park, JB; *Biomaterials Science and Engineering*; New York: Plenum Press, 1984.
- [7] Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., & Leong, K. W. (2001). "Biomedical applications of polymer-composite materials : a review", p. 61.
- [8] Black, J; Hastings, GW. "Handbook of Biomaterials Properties"; London, UK;Chapman and Hall, 1998.
- [9] Williams, DF. "Consensus and definitions in biomaterials". *Advances in Biomaterials*. Eksevier Science: Amsterdam, 1998. p. 11-16.
- [10] Wintermantel, E; Mayer, J. "Anisotropic biomaterials strategies and developments for implants". *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Part B-1. Marcel Dekker. New Yourk, 1995. p. 3-42.
- [11] Hench, LL."Bioceramics: from concept to clinic". *J American Ceramic Society* 1991;74:1487-510.
- [12] Flagg, B. "Newextrusion techniques advance cateter design, *MD+DI* (2013)
- [13] Pruitt, L; Furmanski, J. "Polymeric Biomaterials for load-bearing medical devices, *JOM* 61, 2009, p.14-20.
- [14] Capperauld, I. "Sature Materials: Review", *Clin. Mater.*4, 1989, p. 3-12.
- [15] Klinge, U; Klosterhalfen, B; Ottinger, AP; Junge, V. "PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes, *Biomaterials* 23, 2002, p. 3487-3493.
- [16] Kenny, SM; Buggy, M. "BOne Cements and Filters: a review". *Sci. Master. Med.*14, 2003, p. 923-938.
- [17] Ambard, AJ; Muenunghoff, L."Calcium Phosphate Cememt: review of mechanical and biological properties, *J. Prosthodont.* 15, 2006, p.321-328.
- [18] Bruns, L. "Ten Years With Plastics in Nuclear Processing", Transcript Prepared for U.S. Atomic Energy Commission Under Contract, 1974

- [19] Dargaville, T; Mathew, C; Elliott, J; Mowery, D; Assink, R; "Characterization, Performance and Optimization of PVDF as a Piezoelectric Film for Advanced Space Mirror Concepts", 2005 sandia report
- [20] Holmes-Siedle, A. G.; Wilson, P. D.; Verrall, A. P." PVdF: An electronically-active polymer for industry", 1983
- [21] Keer, D. "Pharmaceuticals – Upgrading Purified Water to Today's Standards", ULTRAPURE WATER 10(5), pp. 40-44 (1993).
- [22] X.C. Cao, J. Ma, X.H. Shi, Z.J. Ren. "Effect of TiO₂ nanoparticle size on the performance of PVDF membrane", Applied Surface Science 253 (2006) 2003–2010.
- [23] Sussner, H. "The Piezoelectric Polymer PVF₂, and its Applications", 1979, IEEE Ultrasonic Symposium Proceedings, p. 491.
- [24] Young, T.-H.; Lu, J.-N.; Lin, D.-J.; Chang, C.-L.; Chang, H.-H.; Cheng, L.-P. Immobilization of L-lysine on dense and porous poly(vinylidene fluoride) surfaces for neuron culture. Desalination 2008, p.134–143.
- [25] Neuss, S., Apel, C., Buttler, P., Denecke, B., Dhanasingh, A., Ding, X., ... Zenke, M. (2008). Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. Biomaterials, 2007, p. 302–313.
- [26] Zhang, Q; Wootton, D; Chiou, R; Li D, Lu, B; Lelkes, P; Zhou, J. "Biocompatibility and biodegradation studies of PCL/ β -TCP bone tissue scaffold fabricated by structural porogen method". Department of Mechanical Engineering and Mechanics, Drexel University, Philadelphia, USA. Epub 2012.
- [27] Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. "Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. Progress in Polymer Science", 2007, pp. 1205-1237.
- [28] Schmaljohann, D., "Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews", 2006, pp. 1655-1670.
- [29] M.R.Aguilar, C. E., A. Gallardo, B. Vázquez, and J.S. Román, "Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials". Topics in Tissue Engineering, 2007, Vol. 3.
- [30] Santo, L. (2016). "Shape memory polymer foams. Progress in Aerospace Sciences", 2015, 81,p. 60–65.
- [31] Lendlein, A; Kelch S. "Shape-memory polymers. Angewandte Chemie-International". Edition; 2002, Vol.41, No.12, p. 2034-2057
- [32] Liu, C; Qin, H; Mather, PT. "Review of progress in shape-memory polymers. Journal of Materials Chemistry"; 2007, Vol.17, No.16, p. 1543-1558
- [33] Dole M. "History of the Irradiation Cross-Linking of Polyethylene. Journal of Macromolecular Science-Chemistry"; 1981, Vol.A 15, No.7, p. 1403-1409

- [34] Tobushi, H; Okumura, K; Endo, M; Hayashi S. "Thermomechanical properties of polyurethane shape-memory polymer foam. Shape Memory Materials and Its Applications"; 2001, Vol.394-3, p. 577-580
- [35] Lendlein, A., Behl, M., Hiebl, B., Wischke, C., Lendlein, A., Behl, M... Hiebl, B. "Shape-memory polymers as a technology platform for biomedical applications", 4440. <https://doi.org/10.1586/erd.10.8>, 2014
- [36] Lendlein, A., & Kelch, S. (2002). Shape-Memory Polymers. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(12), 2034.
- [37] Xie, T. (2011). "Recent advances in polymer shape memory. Polymer", doi:10.1016/j.polymer. 2011, 52(22), 4985–5000.
- [38] Hutmacher, DW; "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, 2000
- [39] Webb, EM; Elicker, BM; Webb, WR." Using CT to Diagnose Nonneoplastic Tracheal Abnormalities", *Am. J. Roentgenol.* 2000, 174 1315–21
- [40] Grillo, HC; "Tracheal Replacement: A Critical Review Requirements for Replacement" *Ann Thorac Surg* 2002, 73 1995–2004
- [41] Neville, WE. "Reconstruction of the trachea and stem bronchi with Neville prosthesis". 1982 *Int. Surg.* **67** 229–34
- [42] Neville, WE; Bolanowski, PJ; Soltanzadeh, H." Prosthetic reconstruction of the trachea and carina" . *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **72** 525–38
- [43] Minamoto, H; Terra, RM; Cardoso, PFG. "Estenoses benignas da via aérea: tratamento endoscópico", 2011, *Pulmão RJ* 20 48–53
- [44] Sugarbaker, DJ. "Técnicas diagnósticas e terapêuticas invasivas na doença pulmonar"— Raphael Bueno David J Sugarbak 2018
- [45] Chang, JW; Park, SA; Park, JK; Choi, JW; Kim, YS; Shin, YS; Kim, CH;" Tissue-Engineered Tracheal Reconstruction Using Three-Dimensionally Printed Artificial Tracheal Graft: Preliminary Report" *Artif. 2014 Organs* 38 E95–105
- [46] Fanous N, Husain S A, Ruzmetov M, Rodefeld M D, Turrentine M W and Brown J W 2010 Anterior pericardial tracheoplasty for long-segment tracheal stenosis: Long-term outcomes *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 139 18–25
- [47] Toomes H, Mickisch G and Vogt-Moykopf I 1985 Experiences with prosthetic reconstruction of the trachea and bifurcation. *Thorax* 40 32–7
- [48] Tack, P; Victor, J; Gemmel, P; Annemans, L; "3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review" *Biomed. Eng. Online* 15, 2016
- [49] Morrison, RJ; Hollister, SJ; Niedner, MF; Mahani, MG; Park, AH; Mehta, DK;, ... Green, GE. "Mitigation of tracheobronchomalacia with 3D-printed personalized medical devices in pediatric patients". *Science Translational Medicine*, 7(285), 2015

- [50]Hiller, A; Borchers, K; Tovar, GEM; Southan, A; “Impact of intermediate UV curing and yield stress of 3D printed poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels on interlayer connectivity and maximum build height” *Addit. Manuf.* 18 136–44, 2017
- [51] Yan, Q; Dong, H; Su, J; Han, J; Song, B; Wei, Q; & Shi, Y. “A Review of 3D Printing Technology for Medical Applications”. *Engineering*. doi:10.1016/j.eng.2018.07.021. 2018
- [52] Mannoor, MS; Jiang, Z; James, T; Kong, YL; Malatesta, KA; Soboyejo, WO, ... Mcalpine, MC. “3D Printed Bionic Ears”. 2013, *Nano Lett.*, 2013, 13 (6), pp 2634–2639
- [53] Mannoor, MS; Jiang, Z; James, T; Kong, YL; Malatesta, KA; Soboyejo, WO., ... Mcalpine, MC. “3D Printed Bionic Ears”. *Nano Lett.*, **2013**, 13 (6), 2013, p. 2634–2639
- [54] Riss, T. L., Niles, A. L., & Minor, L. “Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual”, 2018,1–23.doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
- [55] Safshekan, F. “Investigation of the Mechanical Properties of the Human Tracheal Cartilage”, 2017, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Iran 16(2), 107–114.
- [56] Cristóvão, A; “3D Printing of Biocompatible Materials for Biomedical Applications”. Lisboa: FCT-UNL, 2018, Tese de Mestrado